

**BEST AVAILABLE COPY****PCT**WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification <sup>6</sup> :  <b>G01B 9/02</b>		A1	(11) International Publication Number: <b>WO 97/21979</b>  (43) International Publication Date: 19 June 1997 (19.06.97)
<p>(21) International Application Number: PCT/US96/20024</p> <p>(22) International Filing Date: 10 December 1996 (10.12.96)</p> <p>(30) Priority Data: 08/571,047 12 December 1995 (12.12.95) US</p> <p>(71) Applicant (<i>for all designated States except US</i>): SPECTRAL DIAGNOSTIC LTD. [IL/IL]; P.O. Box 101, 10551 Migdal Haernek (IL).</p> <p>(72) Inventors; and</p> <p>(75) Inventors/Applicants (<i>for US only</i>): GARINI, Yuval [IL/IL]; 20126 Mizpe Koranit (IL). KATZIR, Nir [IL/IL]; 3 Hagalil, 23800 Givat Elah (IL). SOENKSEN, Dirk, G. [US/US]; 3639 Cheshire, Carlsbad, CA 92008 (US). CABIB, Dario [IL/IL]; 7 Habrosh, 23840 Timrat (IL). BUCKWALD, Robert, A. [US/IL]; Hadagan Street, 30095 Ramat Yishai (IL). MALIK, Zvi [IL/IL]; 38955 Kfar Haroe (IL).</p> <p>(74) Agent: FRIEDMAN, Mark, M.; c/o Sheinbein, Robert, 2940 Birchtree Lane, Silver Spring, MD 20906 (US).</p>		<p>(81) Designated States: IL, JP, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Published</b> <i>With international search report.</i></p>	
<p>(54) Title: SPECTRAL BIO-IMAGING METHODS FOR BIOLOGICAL RESEARCH, MEDICAL DIAGNOSTICS AND THERAPY</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Spectral imaging methods (fig. 2) for biological research, medical diagnostics and therapy to be used to detect spatial organization and to quantify cellular (fig. 5) and tissue natural constituents, structures, organelles and administered components such as tagging probes (fig. 27) and drugs using light transmission (fig. 9), reflection, scattering and fluorescence emission strategies (fig. 7), with high sensitivity and high spatial and spectral resolutions.</p>			





金鏡子ノンケンの実験が製出器ノレーラの面上で昇正し制定の状態となるようにし、前記排出器要素の各々によって、各時点についての光路の開散として、異なる波長で前記ビックセルから発せられた光の強度の特定の一次結合となる信号を生成し、(iv) 干渉計システムの一つもしくは複数の要素を回路走査することによって、この干渉計システムにより作られた二つの干渉ビーム間の光路差を、生物サンプルの全ピクセルについて同時に測定することができる。また、

(v) 記録装置を用いて時間の閾値として各排出器エントリの信号を記録し、第1スベクトルキューブデータを形成して、生物サンプルの各ピクセルのスペクトルを得るステップ、及び

(vi) 数学的アルゴリズムを用いて前記第1スベクトルキューブデータを変換するステップ、からなることを特徴とする蛍光回収方法。

[請求項64] 前記数学的アルゴリズムが分類マッピング解釈であり、これにより、各ピクセルのスペクトルににおけるいくつかの参照スペクトルからのスペクトル差を計算することを特徴とする請求項63に記載の方法。

[請求項65] 前記数学的アルゴリズムが一次結合解釈であり、背景を除去するためのものであることを特徴とする請求項62に記載の方法。

[請求項66] 追加の数学的アルゴリズムとしての分類マッピング解釈を用いるステップをさらに有し、この追加機能的アルゴリズムにより前記各ピクセルのスペクトルを閲覧して、少なくとも一つの参照スペクトルとのスペクトル差を計算することを特徴とする請求項65に記載の方法。

[請求項67] 前記分類マッピング解釈が、前記各ピクセルのスペクトルに關して、少なくとも一つの参照スペクトルとのスペクトル差を計算するステップを含むことを特徴とする請求項66に記載の方法。

[請求項68] 前記分類マッピング解釈が、前記各ピクセルのスペクトルに關して、少なくとも一つの参照スペクトルとのスペクトル差を計算するステップを含むことを特徴とする請求項66に記載の方法。

[請求項69] (a) 解析用の細胞スマニアを準備するステップ、

(b) 線維分光計に光学的に繋がった透過顯微鏡により前細胞スマニアを観察する間に、

(i) 行平行光素を用いて細胞スマニアの全ピクセルからの射出光を同時に集光し、

(ii) この射出平行光を複数の要素を有する干渉計システムに通して、干渉計内を異なる方向に通じて二つの干渉ビームに分離し、そして、これら二つの干渉ビームを互いに干渉させて再結合させ反射ビームを生成し、

(iii) この反射ビームを合焦光学システムに通して二

05 前記検出器要素の各々において、各時点において同一のビックセルの像となり、該サンプルの実像が検出器アレーの面上で静止して測定の全期間にわたり該像が可視的で、かつ、離別可能な状態となるようにし、

前記検出器要素の各々によって、各時点についての光路差の像数として、異なる波長で前記ビックセルから発せられた光の強度の特定の一組結合となる像号を生成し、

10 (iv) 干渉計システムの一つもしくは複数の要素を回転させることによって、干渉計システムにより作られた二つの干渉ビーム間の光路差を、細胞スマニアの金ピクセルについて同時に走査し、

15 (v) 配線装置を用いて時間の関数として各検出エレメントの信号を配線して、第1スペクトルキープデータを形成し、細胞スマニアの各ピクセルのスペクトルを得るステップ、及び

(c) 細胞的アルゴリズムを用いて前記第1スペクトルキープデータを変換するステップ、

20 キューブデータを変換することを特徴とする細胞分類方法。  
からなることを特徴とする細胞分類方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野及び背景

25 本発明はスペクトル法に関する、さらに詳しくは、生物学研究、医療診断および治療用の分光撮像(イメージング)法に関する、以下、この方法を分光生物撮像法と称する。本発明によく用いられる方法は、空間的な構成(すなわち、分光器および固体トランジスターフォード(例では、光電管)による光強度を利用するコンボーネント、並びに光透達、反射、散乱および暗漏光を利用する遮断剤等、高い空間およびスペクトル解像度で計量したりするために用いることができる。

30 分光計は、光を受光してその成分波長に分離(分散)させ、波長を調節する光の強度である光スペクトルを測定するために設計された装置である。撮像(イメージング)分光計は、対象から射出される光集めで各ピクセル(圖案)のスペクトルを測定する装置である。

35 分光法は、化学成分のスペクトル特性に基づつて材料およびプロセスを帶別付けるために、科学および産業分野において何十年も用いられてきている周知の分析ツールである。分光学の物理的原理は、光と物質との相互作用である。従統的に、分光学は、サンプルからの射出光、透過光、散乱光および反射光の強度を、波長の関数として、高いスペクトル解像度で、測定するものであるが、空間的な構造は有していない。

40 一方、高い解像度の分光学と高い解像度の撮像法(すなわち、空間情報)との合成である分光撮像(スペクトル撮像)法は、生物サンプルの解析には用いられていない

45

50

v. 現在の所で最も近いものとしては、  
トレン情報のみを提供しつつ生物サンプル  
像の情報を得る物があるだけである。  
例の比如て、「一つもくはいつかの  
スフィルター」を用いて高い空間解像度  
がある (Anderson-Efros & による  
ある (Alfano等による米国特許第4,  
1,205, pp. 179-189 (1990) 参照)  
のいへつかの点もしくはサンプル全体  
空間的な解像度 (例えは、全スペク  
トル)。された後において、特  
ば、蛋白質、核酸配列の検出がある。  
像撮影 (1)の測定でいへつかの當  
にその分布を特定するために用いるこ  
と、分光撮像法に固有の高い解像度は  
クトル領域を有した蛍光プローブ (も  
半分) を分離するのに適している。  
法は、像のどの位置であっても、サン  
均一性 (例えは、細胞) により生じる  
シフトの検出也可能である。

概念上は、分光生物撮像システムは  
テムと、(2) 解析ソフトウェアと  
テムは、光学および電子工学の全てを  
照機能 (例えは、光路の選定)、測  
光もしくは透過から、測定結果から  
するに最適な校正まで含む。解析  
重要な結果を有意義な方法で解析し、  
必要な全てのソフトウェアおよび數学  
を含む。

分光撮像法は、スペクトル吸収特性  
および他の感度の内部研究を遙隔検査  
て、何十年にわたって用いられてきて  
ら、遙隔検査式の分光撮像システム (ム  
ツ、AVIRIS) は、コストが高く、大  
であるため、その用途は航空および衛  
星 (Maymon and Fleisch (1988) に  
of SPIE—Recent Advances in Sensors  
Data Processing for Remote Sensing,  
22: Noiri (1988) による (Proceedings  
Advances in Sensors, Radiometry :  
ing for Remote Sensing, 924, pp.23-  
1)。

分光生物撮像システムと見なされる  
イフのスペクトル分離法がある。それ  
ル格子法、(ii) スペクトルフィルタ  
SPE—Bioluminescence and Two-Dimensional  
spectroscopyのみを提供しつつ生物サンプ  
像の情報を得る物があるだけである。  
例の比如て、「一つもくはいつかの  
スフィルター」を用いて高い空間解像度  
がある (Anderson-Efros & による  
ある (Alfano等による米国特許第4,  
1,205, pp. 179-189 (1990) 参照)  
のいへつかの点もしくはサンプル全体  
空間的な解像度 (例えは、全スペク  
トル)。された後において、特  
ば、蛋白質、核酸配列の検出がある。  
像撮影 (1)の測定でいへつかの當  
にその分布を特定するために用いるこ  
と、分光撮像法に固有の高い解像度は  
クトル領域を有した蛍光プローブ (も  
半分) を分離するのに適している。  
法は、像のどの位置であっても、サン  
均一性 (例えは、細胞) により生じる  
シフトの検出也可能である。

概念上は、分光生物撮像システムは  
テムと、(2) 解析ソフトウェアと  
テムは、光学および電子工学の全てを  
照機能 (例えは、光路の選定)、測  
光もしくは透過から、測定結果から  
するに最適な校正まで含む。解析  
重要な結果を有意義な方法で解析し、  
必要な全てのソフトウェアおよび數学  
を含む。

分光撮像法は、スペクトル吸収特性  
および他の感度の内部研究を遙隔検査  
て、何十年にわたって用いられてきて  
ら、遙隔検査式の分光撮像システム (ム  
ツ、AVIRIS) は、コストが高く、大  
であるため、その用途は航空および衛  
星 (Maymon and Fleisch (1988) に  
of SPIE—Recent Advances in Sensors  
Data Processing for Remote Sensing,  
22: Noiri (1988) による (Proceedings  
Advances in Sensors, Radiometry :  
ing for Remote Sensing, 924, pp.23-  
1)。

究および医学的分光分析法の発展に貢献した。このように「空間的」の撮像を行うもう一つの方法は、独立したバンド毎に撮像を行って、それらを組合せることによって、より複雑な構造を解明するものである。また、サンプルを複数枚に分けて撮影する場合、各枚の撮像結果を組合せることで、より複雑な構造を解明することができる。実際の撮像では、複数枚のサンプルを並べて撮影する場合、各サンプルの位置を正確に合わせる必要がある。また、撮影するサンプルの大きさや形状が異なる場合、各サンプルの位置を正確に合わせる必要がある。

1) 分光法による測定結果の例

2) BGS(光散乱法)による測定結果の例

3) 分散法による測定結果の例

4) 分散法による測定結果の例

5) 分散法による測定結果の例

ユーナーブルフィルターを用いる利点の一つは、任意に波長を選択できること、すなわち、フィルターホールを用いることなく、任意の順序で多くの波長での強度分布イメージを測定できる能力である。しかしながら、ATFおよびBLTFでは、(i) スペクトルレンジが限られ(例えは、 $\lambda_{\text{max}} = 2.1 \text{ nm}$ )、このレンジ外の光は全て遮断されなければならない、(ii) 温度に敏感である、(iii) 透過率が低い、(iv) 面光性がある、(v) ATFの場合は波長走査中にイメージシフト効果があるという欠点を有する。

このようなフィルターおよびデューナーブルフィルターベースのシステムは全て、スペクトル強度分布に影響があり、感度が低く、簡便性に欠け、データの収集および表示のためのソフトウェアアリゴリズムが複雑であるため、どのような用途においても分光鏡像としては長年にわたって維持して且つ広範囲にわたって用いられるものではなかった。上述のように、本発明の発明者は、光干渉撮像分光計およびここで提案されているような解析および表示アルゴリズムを用い、生体臨床医学に適用できる高解像度の撮像系と組み合わせられた高解像度の分光学について述べた文献や、特許は見つかった。例えは、(1) *In situ Hybridization in der genetischen diagnostik*, Faculty of theoretical medicine Ruprecht-Karls University Heidelberg, (2) *細胞内の薬剤分布に関する研究*としてManfait and Charonov (1995) *Fluorescence spectrscopic imaging: State of the art and perspectives. A FC CYTOMETRY '95, Reims, France, Sep. 27th-29th, 1995*において発表された文献、(3) *組織ガン検診に關して*:Alfano et al.による米国特許第4,930,516号:Andersson-Engels (1990) *Proceedings of SPIE Bio-imaging and Two-dimensional Spectroscopy*, 1205, pp. 179-189, およびD'Amato et al. (1995) *Paper presented at European Biomedical Optics Week by SPIE*, 12-16 September 1995, Barcelona, Spain. (4) *細胞レベルにおけるガンの特徴表示に關して*:Med et al. (1981) *Computer Discrimination of Ectocervical Cells, The International Academy of Cytology Analytical and Quantitative Cytology*, Vol. 3, p. 225. (5) *眼科学に關して*:Dobri (1995) *Appl. Optics* Vol. 27, 1113, 1998 およびAppl. Optics Vol. 28, 1061, 並びにスリストカメラおよび垂直血管造影に関するその他の文献、例えは、John B. Wellman (1987) *Imaging Spectrometers for Terrestrial and Planetary Remote Sensing*, SPIE Proceedings, Vol. 750, p. 140に述べられている "whisk broom" を考えてみる。ここで、フニクリニアアレイにおける検出器の数とし、 $m \times n$  をフレーム内のみのピクセル数とし、 $T$ をフレーム時間とする。

このように、各フレームにおける各ピクセルの使用時間と検出器アレイ全体について合計した時間は、 $m \times n \times T$ である。米国特許出願第08/392,019号に開示の説明に係る方法においては、モジュレーーティング機能がランダムレンジによっての平均が50%となる振幅調節(例えは、ファーリペロ-Fabry-Pérotを有した低フィンスエアリー関数 (low finesse Airy function) のようなジタード (Hochstein) もしくはこれと同様の周期的な関数) であるので、1のオーダーとなる。干涉計の教科書(例えは、Chamberlain (1979) *The principles of interferometric spectroscopy*, John Wiley and Sons, pp. 16-18 and p. 265参照) に述べられているFringing効果(もしくは多重効果)の処理に基づけば、本発明に係る装置は、ノイズレベルが信号からは離れているというノイズ制限条件(システムもしくはドックグランンドノイズが假定される条件)においては、 $n^{1/2}$ のファクターで改善され、且つ、前記制限が信号光子サイズにより生じる場合での幾何ビーグル波長におけるスペクトルレンジにおいて、帯定の波長の信号に対する平均信号の比の平方根で改善されるようなSNRの測定を有するということが示すことができる。このように、スベクトル出願第08/392,019号に開示の説明によれば、スペクトル出射装置に必要な全情報を得るために、必要O/Pの全ての画像の全ピクセルについて同時に走査され、これにより、画像情報をとともにスペクトル情報を同時に集められる。この発明は、遠隔検査のための遠隔、実験室での解析用の領域、産業でのモニター用の光ファイバーおよび医学的な撮像、診断、治療等のような様々な光学的な構成として用いられる。

分光生物量検査システムは、潜在的に、画像中の空間分布および組織を注目すべき化学成分間で、微妙なスペクトル差が生ずる適用例に有用である。この計測は、本質的には、特許出願第08/392,019号に述べられるシステムに付属のいずれかの光学生システムを用いて行われる。このようないわゆる光学生システムとしては、例立ちしくは反転型顕微鏡、蛍光顕微鏡、マクロレンズ、内視鏡および顕微カメラがある。さらに、光透過(明視野等)および暗視野(自己蛍光および蛍光プローブの蛍光等を含む標準的な検査方法を用いることができる。

蛍光計測は、出力スペクトルがシステム感度のスペクトルレンジ内にあると仮定して、標準フィルターキューブ(バイアフィルター、励起フィルターおよびダイクロイックミラーからなる)もしくは特殊用途のカスタマイズされたフィルターキューブを用いて行うことができる。分析生物学検査法は、暗視野および特許のようないわゆる"whisk broom"を作り出すことができる。これにより非常に高いサンプルスループットが達成でき、本質的にフレームの数に制限されない解析が可能となる。

本発明の別の目的は、生体コンポーネントから白色光外光もしくはレーザー励起蛍光スペクトルの測定的・構造的・機能的・物理的・生物的性質を測定する。これらは、組織や細胞の構造、機能、活性度などを評価するための有用な指標である。このように、本発明によれば、特定のピクセルについて全検出器の合計使用

時間が、 $nT/m$ である。しかしながら、從来の格子法においては各時間において全検出器によって見られるエネルギーは、波長強度がそのレンジの $1/n$ であるので、医に与える化学生理および病理的な兆候等である。

上記の点で優れている画像のスペクトル解析用の方法および装置が、1995年2月21日出願のCabilisによる米国特許出願第08/392,019号に開示されている。なお、こ

の特許出願は、画像のスペクトル解析用の装置および方法を提供するために、全て本件出願の内容として取り込まれる。この装置および方法によれば、画像からの射出

光を集め得られる全周波数を有効に利用して、從来のス

リットタイプもしくはフィルタータイプの画像スペクトルメーターに比べて、フレーム時間大きく低減しさらにもしくはSNRを大きく向上させ、さらにライン走査を含まない。本発明によれば、各ピクセルのスペクトル强度を求め、対象の光学イメージを解析する方法が提供される。このため、対象からの射出光を集め、各ピクセルからの射出光のスペクトル強度をリニアに集めた所定セットに対応して、調整された光を射出させる干渉計を通過ぎ、この干渉計からの光を検出器アレイの上に集め、各ピクセルについて独立して且つ同時に光干渉計アレイの出力(全ピクセルのそれを干渉計)を検出器に集め、干渉計全体、干涉計内の一要素もしくは入射光の入射角を変動させて0度が変えられて干渉像が作られる。これら全ての場合において、スキャナーハンドル走査の一回の走査を完了すると、画面に全ピクセルの干渉像が形成する。

上記の特性を有した装置は、上述のように干渉計を用いており、従来のスリットタイプもしくはハイ

ルタータイプの画像スペクトルメーターと異なり、このため、集めたエネルギーを小孔もしくはスリットにて観察したり、干渉もしくはチューナーブルフィルターにより狭い波長域を限定することなく、結果、システム全体としてのスループットが向上する。このように干渉計ベースの装置は、解析すべき対象からの射出光から得られる全情報を有利に利用でき、測定時間を大幅に減らさせてさらにもしくはSNR(けんざわら、感度)を上げ向上させる。例えは、John B. Wellman (1987) *Imaging Spectrometers for Terrestrial and Planetary Remote Sensing*, SPIE Proceedings, Vol. 750, p. 140に述べられている "whisk broom" を考えてみる。ここで、フニクリニアアレイにおける検出器の数とし、 $m \times n$  をフレーム内のピクセル数とし、 $T$ をフレーム時間とする。

一つのフレームにおける各ピクセルの使用時間と検出器アレイ全体について合計した時間は、 $m \times n \times T$ である。米

国特許出願第08/392,019号に開示の説明の場

合には、同サイズのアレイで同一のフレームレートを用いれば、特定のピクセルについて全検出器の合計使

用が得られる組み合わせ、結果を解析し表示するために用いられるアルゴリズム、そして最後に、細胞および/もしくは組織レベルにおいて診療医、研究者もしくは外科医に与える化学生理および病理的な兆候等である。

上記の点で優れている画像のスペクトル解析用の方法および装置が、1995年2月21日出願のCabilisによる米国特許出願第08/392,019号に開示されている。なお、こ

の特許出願は、画像のスペクトル解析用の装置および方法を提供するために、全て本件出願の内容として取り込まれる。この装置および方法によれば、画像からの射出

光を集め得られる全周波数を有効に利用して、從来のス

リットタイプもしくはフィルタータイプの画像スペクトルメーターに比べて、フレーム時間大きく低減しさらにもしくはSNRを大きく向上させ、さらにライン走査を含まない。本発明によれば、各ピクセルのスペクトル强度を求めて、対象の光学イメージを解析する方法が提供される。このため、対象からの射出光を集め、各ピクセルからの射出光のスペクトル強度をリニアに集めた所定セットに対応して、調整された光を射出させる干渉計を通過ぎ、この干渉計からの光を検出器アレイの上に集め、各ピクセルについて独立して且つ同時に光干渉計アレイの出力(全ピクセルのそれを干渉計)を検出器に集め、干渉計全体、干涉計内の一要素もしくは入射光の入射角を変動させて0度が変えられて干渉像が作られる。これら全ての場合において、スキャナーハンドル走査の一回の走査を完了すると、画面に全ピクセルの干渉像が形成する。

上記の特性を有した装置は、上述のように干渉計を用いており、従来のスリットタイプもしくはハイ

ルタータイプの画像スペクトルメーターと異なり、このため、集めたエネルギーを小孔もしくはスリットにて観察したり、干渉もしくはチューナーブルフィルターにより狭い波長域を限定することなく、結果、システム全体としてのスループットが向上する。このように干渉計ベースの装置は、解析すべき対象からの射出光から得られる全情報を有利に利用でき、測定時間を大幅に減らさせてさらにもしくはSNR(けんざわら、感度)を上げ向上させる。例えは、John B. Wellman (1987) *Imaging Spectrometers for Terrestrial and Planetary Remote Sensing*, SPIE Proceedings, Vol. 750, p. 140に述べられている "whisk broom" を考えてみる。ここで、フニクリニアアレイにおける検出器の数とし、 $m \times n$  をフレーム内のピクセル数とし、 $T$ をフレーム時間とする。

一つのフレームにおける各ピクセルの使用時間と検出器アレイ全体について合計した時間は、 $m \times n \times T$ である。米

国特許出願第08/392,019号に開示の説明の場

合には、同サイズのアレイで同一のフレームレートを用いれば、特定のピクセルについて全検出器の合計使

用が得られる組み合わせ、結果を解析し表示するために用いられるアルゴリズム、そして最後に、細胞および/もしくは組織レベルにおいて診療医、研究者もしくは外科医に与える化学生理および病理的な兆候等である。

上記の点で優れている画像のスペクトル解析用の方法および装置が、1995年2月21日出願のCabilisによる米国特許出願第08/392,019号に開示されている。なお、こ

の特許出願は、画像のスペクトル解析用の装置および方法を提供するために、全て本件出願の内容として取り込まれる。この装置および方法によれば、画像からの射出

光を集め得られる全周波数を有効に利用して、從来のス

リットタイプもしくはフィルタータイプの画像スペクトルメーターに比べて、フレーム時間大きく低減しさらにもしくはSNRを大きく向上させ、さらにライン走査を含まない。本発明によれば、各ピクセルのスペクトル强度を求めて、対象の光学イメージを解析する方法が提供される。このため、対象からの射出光を集め、各ピクセルからの射出光のスペクトル強度をリニアに集めた所定セットに対応して、調整された光を射出させる干渉計を通過ぎ、この干渉計からの光を検出器アレイの上に集め、各ピクセルについて独立して且つ同時に光干渉計アレイの出力(全ピクセルのそれを干渉計)を検出器に集め、干渉計全体、干涉計内の一要素もしくは入射光の入射角を変動させて0度が変えられて干渉像が作られる。これら全ての場合において、スキャナーハンドル走査の一回の走査を完了すると、画面に全ピクセルの干渉像が形成する。

上記の特性を有した装置は、上述のように干渉計を用いており、従来のスリットタイプもしくはハイ

ルタータイプの画像スペクトルメーターと異なり、このため、集めたエネルギーを小孔もしくはスリットにて観察したり、干渉もしくはチューナーブルフィルターにより狭い波長域を限定することなく、結果、システム全体としてのスループットが向上する。このように干渉計ベースの装置は、解析すべき対象からの射出光から得られる全情報を有利に利用でき、測定時間を大幅に減らさせてさらにもしくはSNR(けんざわら、感度)を上げ向上させる。例えは、John B. Wellman (1987) *Imaging Spectrometers for Terrestrial and Planetary Remote Sensing*, SPIE Proceedings, Vol. 750, p. 140に述べられている "whisk broom" を考えてみる。ここで、フニクリニアアレイにおける検出器の数とし、 $m \times n$  をフレーム内のピクセル数とし、 $T$ をフレーム時間とする。

一つのフレームにおける各ピクセルの使用時間と検出器アレイ全体について合計した時間は、 $m \times n \times T$ である。米

国特許出願第08/392,019号に開示の説明の場

合には、同サイズのアレイで同一のフレームレートを用いれば、特定のピクセルについて全検出器の合計使

用が得られる組み合わせ、結果を解析し表示するために用いられるアルゴリズム、そして最後に、細胞および/もしくは組織レベルにおいて診療医、研究者もしくは外科医に与える化学生理および病理的な兆候等である。

上記の点で優れている画像のスペクトル解析用の方法および装置が、1995年2月21日出願のCabilisによる米国特許出願第08/392,019号に開示されている。なお、こ

の特許出願は、画像のスペクトル解析用の装置および方法を提供するために、全て本件出願の内容として取り込まれる。この装置および方法によれば、画像からの射出

光を集め得られる全周波数を有効に利用して、從来のス

リットタイプもしくはフィルタータイプの画像スペクトルメーターに比べて、フレーム時間大きく低減しさらにもしくはSNRを大きく向上させ、さらにライン走査を含まない。本発明によれば、各ピクセルのスペクトル强度を求めて、対象の光学イメージを解析する方法が提供される。このため、対象からの射出光を集め、各ピクセルからの射出光のスペクトル強度をリニアに集めた所定セットに対応して、調整された光を射出させる干渉計を通過ぎ、この干渉計からの光を検出器アレイの上に集め、各ピクセルについて独立して且つ同時に光干渉計アレイの出力(全ピクセルのそれを干渉計)を検出器に集め、干渉計全体、干涉計内の一要素もしくは入射光の入射角を変動させて0度が変えられて干渉像が作られる。これら全ての場合において、スキャナーハンドル走査の一回の走査を完了すると、画面に全ピクセルの干渉像が形成する。

上記の特性を有した装置は、上述のように干渉計を用いており、従来のスリットタイプもしくはハイ

ルタータイプの画像スペクトルメーターと異なり、このため、集めたエネルギーを小孔もしくはスリットにて観察したり、干渉もしくはチューナーブルフィルターにより狭い波長域を限定することなく、結果、システム全体としてのスループットが向上する。このように干渉計ベースの装置は、解析すべき対象からの射出光から得られる全情報を有利に利用でき、測定時間を大幅に減らさせてさらにもしくはSNR(けんざわら、感度)を上げ向上させる。例えは、John B. Wellman (1987) *Imaging Spectrometers for Terrestrial and Planetary Remote Sensing*, SPIE Proceedings, Vol. 750, p. 140に述べられている "whisk broom" を考えてみる。ここで、フニクリニアアレイにおける検出器の数とし、 $m \times n$  をフレーム内のピクセル数とし、 $T$ をフレーム時間とする。

一つのフレームにおける各ピクセルの使用時間と検出器アレイ全体について合計した時間は、 $m \times n \times T$ である。米

国特許出願第08/392,019号に開示の説明の場

合には、同サイズのアレイで同一のフレームレートを用いれば、特定のピクセルについて全検出器の合計使

用が得られる組み合わせ、結果を解析し表示するために用いられるアルゴリズム、そして最後に、細胞および/もしくは組織レベルにおいて診療医、研究者もしくは外科医に与える化学生理および病理的な兆候等である。

上記の点で優れている画像のスペクトル解析用の方法および装置が、1995年2月21日出願のCabilisによる米国特許出願第08/392,019号に開示されている。なお、こ

の特許出願は、画像のスペクトル解析用の装置および方法を提供するために、全て本件出願の内容として取り込まれる。この装置および方法によれば、画像からの射出

光を集め得られる全周波数を有効に利用して、從来のス

リットタイプもしくはフィルタータイプの画像スペクトルメーターに比べて、フレーム時間大きく低減しさらにもしくはSNRを大きく向上させ、さらにライン走査を含まない。本発明によれば、各ピクセルのスペクトル强度を求めて、対象の光学イメージを解析する方法が提供される。このため、対象からの射出光を集め、各ピクセルからの射出光のスペクトル強度をリニアに集めた所定セットに対応して、調整された光を射出させる干渉計を通過ぎ、この干渉計からの光を検出器アレイの上に集め、各ピクセルについて独立して且つ同時に光干渉計アレイの出力(全ピクセルのそれを干渉計)を検出器に集め、干渉計全体、干涉計内の一要素もしくは入射光の入射角を変動させて0度が変えられて干渉像が作られる。これら全ての場合において、スキャナーハンドル走査の一回の走査を完了すると、画面に全ピクセルの干渉像が形成する。

上記の特性を有した装置は、上述のように干渉計を用いており、従来のスリットタイプもしくはハイ

ルタータイプの画像スペクトルメーターと異なり、このため、集めたエネルギーを小孔もしくはスリットにて観察したり、干渉もしくはチューナーブルフィルターにより狭い波長域を限定することなく、結果、システム全体としてのスループットが向上する。このように干渉計ベースの装置は、解析すべき対象からの射出光から得られる全情報を有利に利用でき、測定時間を大幅に減らさせてさらにもしくはSNR(けんざわら、感度)を上げ向上させる。例えは、John B. Wellman (1987) *Imaging Spectrometers for Terrestrial and Planetary Remote Sensing*, SPIE Proceedings, Vol. 750, p. 140に述べられている "whisk broom" を考えてみる。ここで、フニクリニアアレイにおける検出器の数とし、 $m \times n$  をフレーム内のピクセル数とし、 $T$ をフレーム時間とする。

一つのフレームにおける各ピクセルの使用時間と検出器アレイ全体について合計した時間は、 $m \times n \times T$ である。米

国特許出願第08/392,019号に開示の説明の場

合には、同サイズのアレイで同一のフレームレートを用いれば、特定のピクセルについて全検出器の合計使

用が得られる組み合わせ、結果を解析し表示するために用いられるアルゴリズム、そして最後に、細胞および/もしくは組織レベルにおいて診療医、研究者もしくは外科医に与える化学生理および病理的な兆候等である。

上記の点で優れている画像のスペクトル解析用の方法および装置が、1995年2月21日出願のCabilisによる米国特許出願第08/392,019号に開示されている。なお、こ

の特許出願は、画像のスペクトル解析用の装置および方法を提供するために、全て本件出願の内容として取り込まれる。この装置および方法によれば、画像からの射出

光を集め得られる全周波数を有効に利用して、從来のス

リットタイプもしくはフィルタータイプの画像スペクトルメーターに比べて、フレーム時間大きく低減しさらにもしくはSNRを大きく向上させ、さらにライン走査を含まない。本発明によれば、各ピクセルのスペクトル强度を求めて、対象の光学イメージを解析する方法が提供される。このため、対象からの射出光を集め、各ピクセルからの射出光のスペクトル強度をリニアに集めた所定セットに対応して、調整された光を射出させる干渉計を通過ぎ、この干渉計からの光を検出器アレイの上に集め、各ピクセルについて独立して且つ同時に光干渉計アレイの出力(全ピクセルのそれを干渉計)を検出器に集め、干渉計全体、干涉計内の一要素もしくは入射光の入射角を変動させて0度が変えられて干渉像が作られる。これら全ての場合において、スキャナーハンドル走査の一回の走査を完了すると、画面に全ピクセルの干渉像が形成する。

上記の特性を有した装置は、上述のように干渉計を用いており、従来のスリットタイプもしくはハイ

ルタータイプの画像スペクトルメーターと異なり、このため、集めたエネルギーを小孔もしくはスリットにて観察したり、干渉もしくはチューナーブルフィルターにより狭い波長域を限定することなく、結果、システム全体としてのスループットが向上する。このように干渉計ベースの装置は、解析すべき対象からの射出光から得られる全情報を有利に利用でき、測定時間を大幅に減らさせてさらにもしくはSNR(けんざわら、感度)を上げ向上させる。例えは、John B. Wellman (1987) *Imaging Spectrometers for Terrestrial and Planetary Remote Sensing*, SPIE Proceedings, Vol. 750, p. 140に述べられている "whisk broom" を考えてみる。ここで、フニクリニアアレイにおける検出器の数とし、 $m \times n$  をフレーム内のピクセル数とし、 $T$ をフレーム時間とする。

一つのフレームにおける各ピクセルの使用時間と検出器アレイ全体について合計した時間は、 $m \times n \times T$ である。米

国特許出願第08/392,019号に開示の説明の場

合には、同サイズのアレイで同一のフレームレートを用いれば、特定のピクセルについて全検出器の合計使

用が得られる組み合わせ、結果を解析し表示するために用いられるアルゴリズム、そして最後に、細胞および/もしくは組織レベルにおいて診療医、研究者もしくは外科医に与える化学生理および病理的な兆候等である。

上記の点で優れている画像のスペクトル解析用の方法および装置が、1995年2月21日出願のCabilisによる米国特許出願第08/392,019号に開示されている。なお、こ

の特許出願は、画像のスペクトル解析用の装置および方法を提供するために、全て本件出願の内容として取り込まれる。この装置および方法によれば、画像からの射出

光を集め得られる全周波数を有効に利用して、從来のス

リットタイプもしくはフィルタータイプの画像スペクトルメーターに比べて、フレーム時間大きく低減しさらにもしくはSNRを大きく向上させ、さらにライン走査を含まない。本発明によれば、各ピクセルのスペクトル强度を求めて、対象の光学イメージを解析する方法が提供される。このため、対象からの射出光を集め、各ピクセルからの射出光のスペクトル強度をリニアに集めた所定セットに対応して、調整された光を射出させる干渉計を通過ぎ、この干渉計からの光を検出器アレイの上に集め、各ピクセルについて独立して且つ同時に光干渉計アレイの出力(全ピクセルのそれを干渉計)を検出器に集め、干渉計全体、干涉計内の一要素もしくは入射光の入射角を変動させて0度がえたる。この装置および方法によれば、画像からの射出

光を集め得られる全周波数を有効に利用して、從来のス

リットタイプもしくはフィルタータイプの画像スペクトルメーターに比べて、フレーム時間大きく低減しさらにもしくはSNRを大きく向上させ、さらにライン走査を含まない。本発明によれば、各ピクセルのスペクトル强度を求めて、対象の光学イメージを解析する方法が提供される。このため、対象からの射出光を集め、各ピクセルからの射出光のスペクトル強度をリニアに集めた所定セットに対応して、調整された光を射出させる干渉計を通過ぎ、この干渉計からの光を検出器アレイの上に集め、各ピクセルについて独立して且つ同時に光干渉計アレイの出力(全ピクセルのそれを干渉計)を検出器に集め、干渉計全体、干涉計内の一要素もしくは入射光の入射角を変動させて0度がえたる。この装置および方法によれば、画像からの射出

光を集め得られる全周波数を有効に利用して、從来のス

リットタイプもしくはフィルタータイプの画像スペクトルメーターに比べて、フレーム時間大きく低減しさらにもしくはSNRを大きく向上させ、さらにライン走査を含まない。本発明によれば、各ピクセルのスペクトル强度を求めて、対象の光学イメージを解析する方法が提供される。このため、対象からの射出光を集め、各ピクセルからの射出光のスペクトル強度をリニアに集めた所定セットに対応して、調整された光を射出させる干渉計を通過ぎ、この干渉計からの光を検出器アレイの上に集め、各ピクセルについて独立して且つ同時に光干渉計アレイの出力(全ピクセルのそれを干渉計)を検出器に集め、干渉計全体、干涉計内の一要素もしくは入射光の入射角を変動させて0度がえたる。この装置および方法によれば、画像からの射出

光を集め得られる全周波数を有効に利用して、從来のス

リットタイプもしくはフィルタータイプの画像スペクトルメーターに比べて、フレーム時間大きく低減しさらにもしくはSNRを大きく向上させ、さらにライン走査を含まない。本発明によれば、各ピクセルのスペクトル强度を求めて、対象の光学イメージを解析する方法が提供される。このため、対象からの射出光を集め、各ピクセルからの射出光のスペクトル強度をリニアに集めた所定セットに対応して、調整された光を射出させる干渉計を通過ぎ、この干渉計からの光を検出器アレイの上に集め、各ピクセルについて独立して且つ同時に光干渉計アレイの出力(全ピクセルのそれを干渉計)を検出器に集め、干渉計全体、干涉計内の一要素もしくは入射光の入射角を変動させて0度がえたる。この装置および方法によれば、画像からの射出

光を集め得られる全周波数を有効に利用して、從来のス

リットタイプもしくはフィルタータイプの画像スペクトルメーターに比べて、フレーム時間大きく低減しさらにもしくはSNRを大きく向上させ、さらにライン走査を含まない。本発明によれば、各ピクセルのスペクトル强度を求めて、対象の光学イメージを解析する方法が提供される。このため、対象からの射出光を集め、各ピクセルからの射出光のスペクトル強度をリニアに集めた所定セットに対応して、調整された光を射出させる干渉計を通過ぎ、この干渉計からの光を検出器アレイの上に集め、各ピクセルについて独立して且つ同時に光干渉計アレイの出力(全ピクセルのそれを干渉計)を検出器に集め、干渉計全体、干涉計内の一要素もしくは入射光の入射角を変動させて0度がえたる。この装置および方法によれば、画像からの射出

光を集め得られる全周波数を有効に利用して、從来のス

リットタイプもしくはフィルタータイプの画像スペクトルメーターに比べて、フレーム時間大きく低減しさらにもしくはSNR

物がなるタル おける特徴によ り導かれる。	50	前記数学 分析による 解説である。 後述の本題明 白は、前記主張 をもとめ、前記 各ビックセ ルの各々に 付する解説によ り導かれる。
における特徴によ り導かれる。	10	ペクトルから なるベクトル差 は、前記類似 幾何学より 導かれる。
における特徴によ り導かれる。	15	ルが小さなスベ クトル差 は、前記幾何 学より導か れる。
における特徴によ り導かれる。	20	ルが大きなスベ クトル差 は、前記幾何 学より導か れる。
における特徴によ り導かれる。	25	て積分して定義 後述の本題明 白は、前記数学 分析により あり、これによ くつかの参考文 献は、前記主張 をもとめ、前記 各ビックセ ルの各々に 付する解説によ り導かれる。
における特徴によ り導かれる。	30	後述の本題明 白は、前記主張 をもとめ、前記 各ビックセ ルの各々に 付する解説によ り導かれる。
における特徴によ り導かれる。	35	れは、前記主張 をもとめ、前記 各ビックセ ルの各々に 付する解説によ り導かれる。
における特徴によ り導かれる。	40	後述の本題明 白は、前記主張 をもとめ、前記 各ビックセ ルの各々に 付する解説によ り導かれる。











に可視化するためのものを含む。

(4) 基底部カメラもしくは機器部、すなわち(i) 痕跡もしくは他の健康状態によって引き起こされる出血のようなららゆる型の痕跡を、分析および初期診断器具の双方として、また網膜の部分が目され、筋的血管および網膜組織をマップするために現在使用されているフルオレセイン血管撮影法の追加物もしくは置換物として、何時治療するかを決定するための治療器具として、マップするため用いられるもの、

(ii) 網膜のレーザ治療中に眼科医が光凝固もしくは切除すべき組織の領域およびもしくは境界を示すための器具とするもの。

上述のように、透過、反射、散乱および螢光光学における分光生物検査系には多くの実験方法および特定の用途がある。よって、全般に、光のような分析すべき放射線は広範な供給源に由来するものとことができる。例えば、供給源は放射線を自然に放出するものであつてランプもしくは他の照明された物体からの反射光を反射もしくは透過するものであつてもよい。また、UV-可见等の適当な照明と共に、また強度が複数分光計に通達するのを防止する適当な手段と共に、各場所に問題となる異常もしくは複数の対象に關する異なった情報を得るために、螢光もしくはランプ分光検出測定を行うことができる。

#### 螢光顕微鏡法

##### 一般論

多数の染料の使用 [Jain (1989), *Fundamentals of Digital Image Processing*, Prentice-Hall International参照] は組織および細胞分析器具のうち、最も強力かつ一般的なもの1つである。したがって、螢光顕微鏡法は光学顕微鏡に用いられる最も重要な実験方法のうちの1つである [Lakowicz (1983) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, London 参照]。螢光プローブは主として特徴の染料が結合する生物学的構造の多様さによる [Faginor (1986), *Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences*, Taylor et al., New York, Alan R. Liss, Inc., 3~28ページ]。螢光プローブの詳細な検討については, Mason (編) (1983) *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, Biological Techniques Series, Sattelle編集, Academic Press Limited, London, およびPlemon and Tanke (1987) *Introduction to Fluorescence Microscopy*, Oxford University Press, Royal Microscopical Societyを参照されたい。

新規かつ、より洗練された多色蛍光染料分子の急速な開発により、これらの染料の潜在力を充分に利用することができる、より進んだ螢光顕微鏡技術への要求が形成され続けるであろう。螢光染料がこれまで与え、今後も、現在行われている研究の進展で与えるであろう革命的な技術についての議論に關しては, Taylor et al (1990) 50

#### 2) , The New Vision of Light Microscopy, American Sc

ientist, 30巻, 332~335ページを参照されたい。

分光生物検査系は単純なフィルタに基づく方法に対してはしばしば困難となり、時には不可能となる。一方、分光生物検査系は (i) 萤光染料の分光形状および分光强度の利点には以下のものが含まれる。(1) 開心のあるサンプル中の染料分子の実際の挙動に対してより多くの定量的知識を提供する完全なスペクトルの測定。(2)

望ましくないバックグラウンド発光によって起る妨害の問題の多くを解消する能力。(3) 萤光プローブの発光スペクトルにそのミクロ環境(例えは温度)によって生じる望ましくないあるいは予期できない分光シフトを考慮してプローブ濃度を決定できるが、これに対して、

螢光強度がパンチドバイタルを用いてのみ測定される場合、このようない分光シフトは検出されず、プローブ濃度分析時に頗る誤差を引き起こす。(4) 萤光像取得の单純化、そして、以下詳述するように、適当な分光分析アルゴリズムと共に使用される場合、单一の測定で多くの分光的に重なった蛍光染料を分離かつマップするが可能である。実際、多変数分析、主成分分析などの他の分光アルゴリズムのようない簡便化されたデータ分析アルゴリズム [Mertens and Maes (1989), Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, Great Britain 参照] を適用することにより、多くの分光的問題を解決する能力を同時に分析することが可能である。

分光生物検査は、望ましくないバックグラウンド発光に因難する問題を導消する手段を提供する。螢光顕微鏡法は典型的には、サンプルが所望の屈折率で励起されかつプローブの螢光発光に対する限られた分光帯域の波長のみが検出器(例えば、眼、カメラ等)に到達するように保証する螢光フィルタを用いて行われる [Mason (編), *Fluorescent and Luminescent Probe for Biological Activity*, Biological Series, Sattelle Press Limited, London]。螢光強度は、各波長において得られた蛍光強度スペクトルに取り付けられたスペクトラルを用いて得たものであり、715nmのビーグーは蛍光プローブを有していることによる。3つのスペクトルが各々2つのビーグーを有していることによりされたい。623nmのビーグーは、35

30 シングルラウンド発光は完全には除去できない [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。望ましくないバックグラウンド放電線はさらに別の励起フィルタ(例えはオリンパスのBG60)もしくは適当なパルスアーマーによって除去される。このようないベーピークを除き最も数オーダー低いので、このようないベーピークを追加することによって除去できない [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。望ましくないバックグラウンド発光の3つの主要な供給源は以下の通りである。(1) ジクロイックミラー、(2) サンプル自然蛍光の吸収、(3) サンプルから放電する自然蛍光は顕著にバックグラウンド蛍光に寄与する。サンプル自然蛍光の吸収は以下の通りである。(1) ジクロイックミラーで完全には遮断されない、(2) サンプルおよび筒には光学的吸収があることによって遮断することができない、(3) サンプル自然蛍光が測定サンプルのそれらと重ならない蛍光を遮断する。この状況を改善するように、従来のCCD像を用いることのできる補正アルゴリズムが存在するが、ノイズを伴う [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。しかしながら、各ピクセルでの蛍光強度の調整として測定する分光生物検査系を用いれば、容易に分析を、開心のある蛍光染料の螢光に対応する波長(例えは623nmビーグーの周辺)のみに限定し、それを用いた測定が可能となる。このように測定が可能となるが、時間のかかり、しばしば複数の結果を得る。この結果得られる、各々異なった蛍光染料の発光強度を示す白黒画像を次いで観察着色され、(容易に得られる市販ソフトウェアと共にデジタルコンピュータを用いて)重ね合わせられる。こうして得られた画像は数個の蛍光標識の位置をそれぞれ異なるカラーフィルタを用いて励起および、時には、より高いS/N比を得るため、CCDカメラの露光時間さえも交代なければならず、螢光強度はDGFMフィルタキューブ(DG580ジクロイックミラー、DG590励起フィルタおよびDP565ハイブリッド)を通して撮影した。図5bは3つの別個の像ピクセルを同時に撮影したものが示す。

萤光顕微鏡法は、螢光強度スペクトルをプロットしたものであるが、時間には、より高いS/N比を得るために、露光時間は完全に遮断することができる。各波長において像の焦点を再調整するため、励起波長を調節することにより、各試料に対し1つづつ蛍光像を得る。(運動部のない) 回転可能なフィルタを選択するのに費やされる時間がより効率を節約することができる。

螢光測定において蛍光像が、望ましくないバックグラウンド強度をどのように除去することができるかの1例を図5a~5dに示す。図5aは大西洋ロビツウムで染色された細胞の螢光像を示す。背景および他の細胞アルゴリズムのようない簡便化されたデータ分析アルゴリズム [Mertens and Maes (1989), Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, Great Britain 参照] を適用することにより、多くの分光的問題を解決する能力を同時に分析することが可能である。

萤光顕微鏡は、望ましくないバックグラウンド発光に因難する問題を導消する手段を提供する。萤光顕微鏡法は典型的には、サンプルが所望の屈折率で励起されかつプローブの螢光発光に対する限られた分光帯域の波長のみが検出器(例えば、眼、カメラ等)に到達するように保証する萤光フィルタを用いて行われる [Mason (編), *Fluorescent and Luminescent Probe for Biological Activity*, Biological Series, Sattelle Press Limited, London]。萤光強度は、各波長において得られた蛍光強度スペクトルに取り付けられたスペクトラルを用いて得たものであり、715nmのビーグーは蛍光プローブを有していることによる。3つのスペクトルが各々2つのビーグーを有していることによりされたい。623nmのビーグーは、35

30 シングルラウンド発光は完全には除去できない [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。望ましくないバックグラウンド放電線はさらに別の励起フィルタ(例えはオリンパスのBG60)もしくは適当なパルスアーマーによって除去される。このようないベーピークを除き最も数オーダー低いので、このようないベーピークを追加することによって除去できない [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。望ましくないバックグラウンド発光の3つの主要な供給源は以下の通りである。(1) ジクロイックミラーで完全には遮断されない、(2) サンプルおよび筒には光学的吸収があることによって遮断することができない、(3) サンプル自然蛍光が測定サンプルのそれらと重ならない蛍光を遮断する。この状況を改善するように、従来のCCD像を用いることのできる補正アルゴリズムが存在するが、ノイズを伴う [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。しかしながら、各ピクセルでの蛍光強度の調整として測定する分光生物検査系を用いれば、容易に分析を、開心のある蛍光染料の螢光に対応する波長(例えは623nmビーグーの周辺)のみに限定し、それを用いた測定が可能となる。このように測定が可能となるが、時間のかかり、しばしば複数の結果を得る。この結果得られる、各々異なった蛍光染料の発光強度を示す白黒画像を次いで観察着色され、(容易に得られる市販ソフトウェアと共にデジタルコンピュータを用いて)重ね合わせられる。こうして得られた画像は数個の蛍光標識の位置をそれぞれ異なるカラーフィルタを用いて励起および、時には、より高いS/N比を得るために、露光時間は完全に遮断することができる。各波長において像の焦点を再調整するため、励起波長を調節することにより、各試料に対し1つづつ蛍光像を得る。(運動部のない) 回転可能なフィルタを選択するのに費やされる時間がより効率を節約することができる。

萤光測定において蛍光像が、望ましくないバックグラウンド強度をどのように除去することができるかの1例を図5a~5dに示す。図5aは大西洋ロビツウムで染色された細胞の螢光像を示す。背景および他の細胞アルゴリズムのようない簡便化されたデータ分析アルゴリズム [Mertens and Maes (1989), Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, Great Britain 参照] を適用することにより、多くの分光的問題を解決する能力を同時に分析することが可能である。

萤光顕微鏡は、望ましくないバックグラウンド発光に因難する問題を導消する手段を提供する。萤光顕微鏡法は典型的には、サンプルが所望の屈折率で励起されかつプローブの螢光発光に対する限られた分光帯域の波長のみが検出器(例えば、眼、カメラ等)に到達するように保証する萤光フィルタを用いて行われる [Mason (編), *Fluorescent and Luminescent Probe for Biological Activity*, Biological Series, Sattelle Press Limited, London]。萤光強度は、各波長において得られた蛍光強度スペクトルに取り付けられたスペクトラルを用いて得たものであり、715nmのビーグーは蛍光プローブを有していることによる。3つのスペクトルが各々2つのビーグーを有していることによりされたい。623nmのビーグーは、35

30 シングルラウンド発光は完全には除去できない [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。望ましくないバックグラウンド放電線はさらに別の励起フィルタ(例えはオリンパスのBG60)もしくは適当なパルスアーマーによって除去される。このようないベーピークを除き最も数オーダー低いので、このようないベーピークを追加することによって除去できない [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。望ましくないバックグラウンド発光の3つの主要な供給源は以下の通りである。(1) ジクロイックミラーで完全には遮断されない、(2) サンプルおよび筒には光学的吸収があることによって遮断することができない、(3) サンプル自然蛍光が測定サンプルのそれらと重ならない蛍光を遮断する。この状況を改善するように、従来のCCD像を用いることのできる補正アルゴリズムが存在するが、ノイズを伴う [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。しかしながら、各ピクセルでの蛍光強度の調整として測定する分光生物検査系を用いれば、容易に分析を、開心のある蛍光染料の螢光に対応する波長(例えは623nmビーグーの周辺)のみに限定し、それを用いた測定が可能となる。このように測定が可能となるが、時間のかかり、しばしば複数の結果を得る。この結果得られる、各々異なった蛍光染料の発光強度を示す白黒画像を次いで観察着色され、(容易に得られる市販ソフトウェアと共にデジタルコンピュータを用いて)重ね合わせられる。こうして得られた画像は数個の蛍光標識の位置をそれぞれ異なるカラーフィルタを用いて励起および、時には、より高いS/N比を得るために、露光時間は完全に遮断することができる。各波長において像の焦点を再調整するため、励起波長を調節することにより、各試料に対し1つづつ蛍光像を得る。(運動部のない) 回転可能なフィルタを選択するのに費やされる時間がより効率を節約することができる。

萤光測定において蛍光像が、望ましくないバックグラウンド強度をどのように除去することができるかの1例を図5a~5dに示す。図5aは大西洋ロビツウムで染色された細胞の螢光像を示す。背景および他の細胞アルゴリズムのようない簡便化されたデータ分析アルゴリズム [Mertens and Maes (1989), Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, Great Britain 参照] を適用することにより、多くの分光的問題を解決する能力を同時に分析することが可能である。

萤光顕微鏡は、望ましくないバックグラウンド発光に因難する問題を導消する手段を提供する。萤光顕微鏡法は典型的には、サンプルが所望の屈折率で励起されかつプローブの螢光発光に対する限られた分光帯域の波長のみが検出器(例えば、眼、カメラ等)に到達するように保証する萤光フィルタを用いて行われる [Mason (編), *Fluorescent and Luminescent Probe for Biological Activity*, Biological Series, Sattelle Press Limited, London]。萤光強度は、各波長において得られた蛍光強度スペクトルに取り付けられたスペクトラルを用いて得たものであり、715nmのビーグーは蛍光プローブを有していることによる。3つのスペクトルが各々2つのビーグーを有していることによりされたい。623nmのビーグーは、35

30 シングルラウンド発光は完全には除去できない [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。望ましくないバックグラウンド放電線はさらに別の励起フィルタ(例えはオリンパスのBG60)もしくは適当なパルスアーマーによって除去される。このようないベーピークを除き最も数オーダー低いので、このようないベーピークを追加することによって除去できない [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。望ましくないバックグラウンド発光の3つの主要な供給源は以下の通りである。(1) ジクロイックミラーで完全には遮断されない、(2) サンプルおよび筒には光学的吸収があることによって遮断することができない、(3) サンプル自然蛍光が測定サンプルのそれらと重ならない蛍光を遮断する。この状況を改善するように、従来のCCD像を用いることのできる補正アルゴリズムが存在するが、ノイズを伴う [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。しかしながら、各ピクセルでの蛍光強度の調整として測定する分光生物検査系を用いれば、容易に分析を、開心のある蛍光染料の螢光に対応する波長(例えは623nmビーグーの周辺)のみに限定し、それを用いた測定が可能となる。このように測定が可能となるが、時間のかかり、しばしば複数の結果を得る。この結果得られる、各々異なった蛍光染料の発光強度を示す白黒画像を次いで観察着色され、(容易に得られる市販ソフトウェアと共にデジタルコンピュータを用いて)重ね合わせられる。こうして得られた画像は数個の蛍光標識の位置をそれぞれ異なるカラーフィルタを用いて励起および、時には、より高いS/N比を得るために、露光時間は完全に遮断することができる。各波長において像の焦点を再調整するため、励起波長を調節することにより、各試料に対し1つづつ蛍光像を得る。(運動部のない) 回転可能なフィルタを選択するのに費やされる時間がより効率を節約することができる。

萤光測定において蛍光像が、望ましくないバックグラウンド強度をどのように除去することができるかの1例を図5a~5dに示す。図5aは大西洋ロビツウムで染色された細胞の螢光像を示す。背景および他の細胞アルゴリズムのようない簡便化されたデータ分析アルゴリズム [Mertens and Maes (1989), Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, Great Britain 参照] を適用することにより、多くの分光的問題を解決する能力を同時に分析することが可能である。

萤光顕微鏡は、望ましくないバックグラウンド発光に因難する問題を導消する手段を提供する。萤光顕微鏡法は典型的には、サンプルが所望の屈折率で励起されかつプローブの螢光発光に対する限られた分光帯域の波長のみが検出器(例えば、眼、カメラ等)に到達するように保証する萤光フィルタを用いて行われる [Mason (編), *Fluorescent and Luminescent Probe for Biological Activity*, Biological Series, Sattelle Press Limited, London]。萤光強度は、各波長において得られた蛍光強度スペクトルに取り付けられたスペクトラルを用いて得たものであり、715nmのビーグーは蛍光プローブを有していることによる。3つのスペクトルが各々2つのビーグーを有していることによりされたい。623nmのビーグーは、35

30 シングルラウンド発光は完全には除去できない [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。望ましくないバックグラウンド放電線はさらに別の励起フィルタ(例えはオリンパスのBG60)もしくは適当なパルスアーマーによって除去される。このようないベーピークを除き最も数オーダー低いので、このようないベーピークを追加することによって除去できない [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。望ましくないバックグラウンド発光の3つの主要な供給源は以下の通りである。(1) ジクロイックミラーで完全には遮断されない、(2) サンプルおよび筒には光学的吸収があることによって遮断することができない、(3) サンプル自然蛍光が測定サンプルのそれらと重ならない蛍光を遮断する。この状況を改善するように、従来のCCD像を用いることのできる補正アルゴリズムが存在するが、ノイズを伴う [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。しかしながら、各ピクセルでの蛍光強度の調整として測定する分光生物検査系を用いれば、容易に分析を、開心のある蛍光染料の螢光に対応する波長(例えは623nmビーグーの周辺)のみに限定し、それを用いた測定が可能となる。このように測定が可能となるが、時間のかかり、しばしば複数の結果を得る。この結果得られる、各々異なった蛍光染料の発光強度を示す白黒画像を次いで観察着色され、(容易に得られる市販ソフトウェアと共にデジタルコンピュータを用いて)重ね合わせられる。こうして得られた画像は数個の蛍光標識の位置をそれぞれ異なるカラーフィルタを用いて励起および、時には、より高いS/N比を得るために、露光時間は完全に遮断することができる。各波長において像の焦点を再調整するため、励起波長を調節することにより、各試料に対し1つづつ蛍光像を得る。(運動部のない) 回転可能なフィルタを選択するのに費やされる時間がより効率を節約することができる。

萤光測定において蛍光像が、望ましくないバックグラウンド強度をどのように除去することができるかの1例を図5a~5dに示す。図5aは大西洋ロビツウムで染色された細胞の螢光像を示す。背景および他の細胞アルゴリズムのようない簡便化されたデータ分析アルゴリズム [Mertens and Maes (1989), Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, Great Britain 参照] を適用することにより、多くの分光的問題を解決する能力を同時に分析することが可能である。

萤光顕微鏡は、望ましくないバックグラウンド発光に因難する問題を導消する手段を提供する。萤光顕微鏡法は典型的には、サンプルが所望の屈折率で励起されかつプローブの螢光発光に対する限られた分光帯域の波長のみが検出器(例えば、眼、カメラ等)に到達するように保証する萤光フィルタを用いて行われる [Mason (編), *Fluorescent and Luminescent Probe for Biological Activity*, Biological Series, Sattelle Press Limited, London]。萤光強度は、各波長において得られた蛍光強度スペクトルに取り付けられたスペクトラルを用いて得たものであり、715nmのビーグーは蛍光プローブを有していることによる。3つのスペクトルが各々2つのビーグーを有していることによりされたい。623nmのビーグーは、35

30 シングルラウンド発光は完全には除去できない [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。望ましくないバックグラウンド放電線はさらに別の励起フィルタ(例えはオリンパスのBG60)もしくは適当なパルスアーマーによって除去される。このようないベーピークを除き最も数オーダー低いので、このようないベーピークを追加することによって除去できない [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。望ましくないバックグラウンド発光の3つの主要な供給源は以下の通りである。(1) ジクロイックミラーで完全には遮断されない、(2) サンプルおよび筒には光学的吸収があることによって遮断することができない、(3) サンプル自然蛍光が測定サンプルのそれらと重ならない蛍光を遮断する。この状況を改善するように、従来のCCD像を用いることのできる補正アルゴリズムが存在するが、ノイズを伴う [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。しかしながら、各ピクセルでの蛍光強度の調整として測定する分光生物検査系を用いれば、容易に分析を、開心のある蛍光染料の螢光に対応する波長(例えは623nmビーグーの周辺)のみに限定し、それを用いた測定が可能となる。このように測定が可能となるが、時間のかかり、しばしば複数の結果を得る。この結果得られる、各々異なった蛍光染料の発光強度を示す白黒画像を次いで観察着色され、(容易に得られる市販ソフトウェアと共にデジタルコンピュータを用いて)重ね合わせられる。こうして得られた画像は数個の蛍光標識の位置をそれぞれ異なるカラーフィルタを用いて励起および、時には、より高いS/N比を得るために、露光時間は完全に遮断することができる。各波長において像の焦点を再調整するため、励起波長を調節することにより、各試料に対し1つづつ蛍光像を得る。(運動部のない) 回転可能なフィルタを選択するのに費やされる時間がより効率を節約することができる。

萤光測定において蛍光像が、望ましくないバックグラウンド強度をどのように除去することができるかの1例を図5a~5dに示す。図5aは大西洋ロビツウムで染色された細胞の螢光像を示す。背景および他の細胞アルゴリズムのようない簡便化されたデータ分析アルゴリズム [Mertens and Maes (1989), Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, Great Britain 参照] を適用することにより、多くの分光的問題を解決する能力を同時に分析することが可能である。

萤光顕微鏡は、望ましくないバックグラウンド発光に因難する問題を導消する手段を提供する。萤光顕微鏡法は典型的には、サンプルが所望の屈折率で励起されかつプローブの螢光発光に対する限られた分光帯域の波長のみが検出器(例えば、眼、カメラ等)に到達するように保証する萤光フィルタを用いて行われる [Mason (編), *Fluorescent and Luminescent Probe for Biological Activity*, Biological Series, Sattelle Press Limited, London]。萤光強度は、各波長において得られた蛍光強度スペクトルに取り付けられたスペクトラルを用いて得たものであり、715nmのビーグーは蛍光プローブを有していることによる。3つのスペクトルが各々2つのビーグーを有していることによりされたい。623nmのビーグーは、35

30 シングルラウンド発光は完全には除去できない [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。望ましくないバックグラウンド放電線はさらに別の励起フィルタ(例えはオリンパスのBG60)もしくは適当なパルスアーマーによって除去される。このようないベーピークを除き最も数オーダー低いので、このようないベーピークを追加することによって除去できない [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。望ましくないバックグラウンド発光の3つの主要な供給源は以下の通りである。(1) ジクロイックミラーで完全には遮断されない、(2) サンプルおよび筒には光学的吸収があることによって遮断することができない、(3) サンプル自然蛍光が測定サンプルのそれらと重ならない蛍光を遮断する。この状況を改善するように、従来のCCD像を用いることのできる補正アルゴリズムが存在するが、ノイズを伴う [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。しかしながら、各ピクセルでの蛍光強度の調整として測定する分光生物検査系を用いれば、容易に分析を、開心のある蛍光染料の螢光に対応する波長(例えは623nmビーグーの周辺)のみに限定し、それを用いた測定が可能となる。このように測定が可能となるが、時間のかかり、しばしば複数の結果を得る。この結果得られる、各々異なった蛍光染料の発光強度を示す白黒画像を次いで観察着色され、(容易に得られる市販ソフトウェアと共にデジタルコンピュータを用いて)重ね合わせられる。こうして得られた画像は数個の蛍光標識の位置をそれぞれ異なるカラーフィルタを用いて励起および、時には、より高いS/N比を得るために、露光時間は完全に遮断することができる。各波長において像の焦点を再調整するため、励起波長を調節することにより、各試料に対し1つづつ蛍光像を得る。(運動部のない) 回転可能なフィルタを選択するのに費やされる時間がより効率を節約することができる。

萤光測定において蛍光像が、望ましくないバックグラウンド強度をどのように除去することができるかの1例を図5a~5dに示す。図5aは大西洋ロビツウムで染色された細胞の螢光像を示す。背景および他の細胞アルゴリズムのようない簡便化されたデータ分析アルゴリズム [Mertens and Maes (1989), Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, Great Britain 参照] を適用することにより、多くの分光的問題を解決する能力を同時に分析することが可能である。

萤光顕微鏡は、望ましくないバックグラウンド発光に因難する問題を導消する手段を提供する。萤光顕微鏡法は典型的には、サンプルが所望の屈折率で励起されかつプローブの螢光発光に対する限られた分光帯域の波長のみが検出器(例えば、眼、カメラ等)に到達するように保証する萤光フィルタを用いて行われる [Mason (編), *Fluorescent and Luminescent Probe for Biological Activity*, Biological Series, Sattelle Press Limited, London]。萤光強度は、各波長において得られた蛍光強度スペクトルに取り付けられたスペクトラルを用いて得たものであり、715nmのビーグーは蛍光プローブを有していることによる。3つのスペクトルが各々2つのビーグーを有していることによりされたい。623nmのビーグーは、35

30 シングルラウンド発光は完全には除去できない [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。望ましくないバックグラウンド放電線はさらに別の励起フィルタ(例えはオリンパスのBG60)もしくは適当なパルスアーマーによって除去される。このようないベーピークを除き最も数オーダー低いので、このようないベーピークを追加することによって除去できない [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。望ましくないバックグラウンド発光の3つの主要な供給源は以下の通りである。(1) ジクロイックミラーで完全には遮断されない、(2) サンプルおよび筒には光学的吸収があることによって遮断することができない、(3) サンプル自然蛍光が測定サンプルのそれらと重ならない蛍光を遮断する。この状況を改善するように、従来のCCD像を用いることのできる補正アルゴリズムが存在するが、ノイズを伴う [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。しかしながら、各ピクセルでの蛍光強度の調整として測定する分光生物検査系を用いれば、容易に分析を、開心のある蛍光染料の螢光に対応する波長(例えは623nmビーグーの周辺)のみに限定し、それを用いた測定が可能となる。このように測定が可能となるが、時間のかかり、しばしば複数の結果を得る。この結果得られる、各々異なった蛍光染料の発光強度を示す白黒画像を次いで観察着色され、(容易に得られる市販ソフトウェアと共にデジタルコンピュータを用いて)重ね合わせられる。こうして得られた画像は数個の蛍光標識の位置をそれぞれ異なるカラーフィルタを用いて励起および、時には、より高いS/N比を得るために、露光時間は完全に遮断することができる。各波長において像の焦点を再調整するため、励起波長を調節することにより、各試料に対し1つづつ蛍光像を得る。(運動部のない) 回転可能なフィルタを選択するのに費やされる時間がより効率を節約することができる。

萤光測定において蛍光像が、望ましくないバックグラウンド強度をどのように除去することができるかの1例を図5a~5dに示す。図5aは大西洋ロビツウムで染色された細胞の螢光像を示す。背景および他の細胞アルゴリズムのようない簡便化されたデータ分析アルゴリズム [Mertens and Maes (1989), Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, Great Britain 参照] を適用することにより、多くの分光的問題を解決する能力を同時に分析することが可能である。

萤光顕微鏡は、望ましくないバックグラウンド発光に因難する問題を導消する手段を提供する。萤光顕微鏡法は典型的には、サンプルが所望の屈折率で励起されかつプローブの螢光発光に対する限られた分光帯域の波長のみが検出器(例えば、眼、カメラ等)に到達するように保証する萤光フィルタを用いて行われる [Mason (編), *Fluorescent and Luminescent Probe for Biological Activity*, Biological Series, Sattelle Press Limited, London]。萤光強度は、各波長において得られた蛍光強度スペクトルに取り付けられたスペクトラルを用いて得たものであり、715nmのビーグーは蛍光プローブを有していることによる。3つのスペクトルが各々2つのビーグーを有していることによりされたい。623nmのビーグーは、35

30 シングルラウンド発光は完全には除去できない [Benson et al (1985), *Cell Biol.*, 100, 1309~1323ページ]。望ましくないバックグラウンド放電線

は無制限の数の染料の蛍光発光を捕捉でき、(1) 重り合わない染料の選択、(2) フィルタキューブの交換、(3) 順位もしくは蛍光フィルタの交換、(4) 点合合わせの必要もなくは露光時間の最適化もしくは画像の供給側で屈折できる適当な染料を選択することにある。難点は、確かに、観察した蛍光特性を有する染料の使用は(例えは顕微鏡下における) 視覚検出をより難にする。しかしながら、この制限は本格的な蛍光分析撮像方法を使用することによって解消される傾向にある。

本發明による分光生

- |   |   |   |   |
|---|---|---|---|
| 料(すなはち、蛍光体、蛍光部分)を1回の測定で同時に測定する事が可能になる。染色体にはなんら別   | がなく、分光的に重なり合う染料(例えはロータミンとテキサスレッド)も後述(実験部5参照)のように適当なアルゴリズムを適用することによって同定し、それらが適切に行われた結果、結果は純粋的で、複数の蛍光スペクトルを注意深く考慮するべきである。これが  | 同時に使用する場合、それらの初期強度、蛍光強度および発光スペクトルを注意深く考慮するべきである。これが   | 同時に使用する場合、それらの初期強度、蛍光強度および発光スペクトルを注意深く考慮するべきである。これが   |
| 出現在画像中にマップすることができる。多くの突変を同時に使用する場合、それらの初期強度、蛍光強度および発光スペクトルを注意深く考慮するべきである。これが  | が適切に行われた結果、結果は純粋的で、複数の蛍光スペクトルを注意深く考慮するべきである。これが   | が適切に行われた結果、結果は純粋的で、複数の蛍光スペクトルを注意深く考慮するべきである。これが   | が適切に行われた結果、結果は純粋的で、複数の蛍光スペクトルを注意深く考慮するべきである。これが   |
| ある。   | ある。   | ある。   | ある。   |
| 45  | 45  | 45  | 45  |
| FISHの多くの用途においては、細胞遺伝学者は頭微鏡  | のもののように多くの複数の染色体遺伝子群は1つもしくは数個のクロマチドのみの追加、欠損もしくは置換を伴う現象が突然変異によって引き起こされる。このような小さな欠損や増殖のある個人に将来の帶状的かつ深窓的な問題を警告することができ、通常な介入を可能にするもので   | のもののように多くの複数の染色体遺伝子群は1つもしくは数個のクロマチドのみの追加、欠損もしくは置換を伴う現象が突然変異によって引き起こされる。このような小さな欠損や増殖のある個人に将来の帶状的かつ深窓的な問題を警告することができ、通常な介入を可能にするもので   | のもののように多くの複数の染色体遺伝子群は1つもしくは数個のクロマチドのみの追加、欠損もしくは置換を伴う現象が突然変異によって引き起こされる。このような小さな欠損や増殖のある個人に将来の帶状的かつ深窓的な問題を警告することができ、通常な介入を可能にするもので   |
| 20  | 20  | 20  | 20  |
| 多年にわたり、細胞遺伝学者は彼らの欠陥を見いだしかねず、定量化するための技術を開発しようと努力してきた。蛍光インシチュハイブリダイゼーション(FISH)は過去25年間に多くの開拓的技術の正確な位置をマッピングされた染料を用いて粒度を測定することも可能である。各多色光プローブの検出が逐層的な利点となり得る重要な1例はFISH(蛍光インシチュハイブリダイゼーション) [Emmanuel (1993), Growth Genetics and Hormones 9, 6-12ページ]であり、これは染色体レベルで遺伝子を分析し、遺伝子増幅、欠落、移転、再配置等の遺伝子欠陥の可能性を発見するために用いられる。 | 多年にわたり、細胞遺伝学者は彼らの欠陥を見いだしかねず、定量化するための技術を開発しようと努力してきた。蛍光インシチュハイブリダイゼーション(FISH)は過去25年間に多くの開拓的技術の正確な位置をマッピングされた染料を用いて粒度を測定することも可能である。各多色光プローブの検出が逐層的な利点となり得る重要な1例はFISH(蛍光インシチュハイブリダイゼーション) [Emmanuel (1993), Growth Genetics and Hormones 9, 6-12ページ]であり、これは染色体レベルで遺伝子を分析し、遺伝子増幅、欠落、移転、再配置等の遺伝子欠陥の可能性を発見するために用いられる。 | 多年にわたり、細胞遺伝学者は彼らの欠陥を見いだしかねず、定量化するための技術を開発しようと努力してきた。蛍光インシチュハイブリダイゼーション(FISH)は過去25年間に多くの開拓的技術の正確な位置をマッピングされた染料を用いて粒度を測定することも可能である。各多色光プローブの検出が逐層的な利点となり得る重要な1例はFISH(蛍光インシチュハイブリダイゼーション) [Emmanuel (1993), Growth Genetics and Hormones 9, 6-12ページ]であり、これは染色体レベルで遺伝子を分析し、遺伝子増幅、欠落、移転、再配置等の遺伝子欠陥の可能性を発見するために用いられる。 | 多年にわたり、細胞遺伝学者は彼らの欠陥を見いだしかねず、定量化するための技術を開発しようと努力してきた。蛍光インシチュハイブリダイゼーション(FISH)は過去25年間に多くの開拓的技術の正確な位置をマッピングされた染料を用いて粒度を測定することも可能である。各多色光プローブの検出が逐層的な利点となり得る重要な1例はFISH(蛍光インシチュハイブリダイゼーション) [Emmanuel (1993), Growth Genetics and Hormones 9, 6-12ページ]であり、これは染色体レベルで遺伝子を分析し、遺伝子増幅、欠落、移転、再配置等の遺伝子欠陥の可能性を発見するために用いられる。 |
| 35  | 35  | 35  | 35  |
| 必要の多いDNAプローブの開発を促進した。また、現在のFISH技術は同時に強力な免疫学的プローブの開発、頭微鏡法および分子生物学法の優れた蛍光染料の量産の增大、および蛍光顕微鏡法に用いられる対物レンズ、照明器および   | ヒトゲノムプロジェクト(HGP)はFISHに心眼を認め、多くの多いDNAプローブの開発を促進した。また、現在のFISH技術は同時に強力な免疫学的プローブの開発、頭微鏡法および分子生物学法の優れた蛍光染料の量産の增大、および蛍光顕微鏡法に用いられる対物レンズ、照明器および   | ヒトゲノムプロジェクト(HGP)はFISHに心眼を認め、多くの多いDNAプローブの開発を促進した。また、現在のFISH技術は同時に強力な免疫学的プローブの開発、頭微鏡法および分子生物学法の優れた蛍光染料の量産の增大、および蛍光顕微鏡法に用いられる対物レンズ、照明器および   | ヒトゲノムプロジェクト(HGP)はFISHに心眼を認め、多くの多いDNAプローブの開発を促進した。また、現在のFISH技術は同時に強力な免疫学的プローブの開発、頭微鏡法および分子生物学法の優れた蛍光染料の量産の增大、および蛍光顕微鏡法に用いられる対物レンズ、照明器および   |
| 40  | 40  | 40  | 40  |
| 遺伝子を同定するのに有用性は多くの要因による。(1) FISHは分離された染色体および細胞内に固定されたDNAプローブ埋め込み組織切片内の全細胞に対して使用できる。(2) これは比較的小さな大きさの大脳を抽出して使用できる。(3) これは比較的小さな大脳を抽出して使用できる。(4) その結果は費用により、多くの診断技術が可能である。(5) 様々なプローブおよび標本型に対する応用開発が可能である。   |
| (6) 高い特異性および敏感度を(7) 典型的には2時間である短い処理時間で得ることができる。   | (6) 高い特異性および敏感度を(7) 典型的には2時間である短い処理時間で得ることができる。   | (6) 高い特異性および敏感度を(7) 典型的には2時間である短い処理時間で得ることができる。   | (6) 高い特異性および敏感度を(7) 典型的には2時間である短い処理時間で得ることができる。   |

2つの着色された標識を単純計数することができる。しかししながら、デジタル画像を処理し、かつそれから各盆地データを抽出することができるという能力により、FISH技術には新たな大きな可能性が追加される。本報明のような適当な複数方法は、標識が同定できるように微弱なFISH画像を強化することができる。容易に追成可能な実験条件下で、これまでの部位自動計数が可能である。また、各標識された部位を測定し、DNA量を計算して、例えば、特定の遺伝子の、存在する複数数を明らかにすることもできる。多色FISHのような新規技術はカラーパターン分析を利用して多数(3, 4, 5およびそれ以上)の蛍光プローブを検出し、定量化する。

正統の法ノ源、

- 染色体上の標識された部位の数、および各部位における標識の強度（遺伝子物質の量）に関する情報を提供することができる。動原体（反復DNA）プローブは各標的部位に存在する複数を測定するために用いられる。

遺伝子座に特異的なプローブは遺伝子物質の小領域の位置をマップするために使用される。これらの型のプローブの双方は原型のままの相間検出および有効分離染色体フレッドに用いることができ、操作的に計数可能である。これには、特定の染色体、染色体群、もしくは遺伝子の複製を過多もしくは過少に有することによって遺伝子の複製を調整するために使用される。

遺伝子の複製を過多もしくは過少にするために慣習的に使用される。ある種の他のごく初期段階においては、細胞が異常に増殖される前に、特定の遺伝子の数が増大する。当分野において遺伝子増幅と呼ばれる現象が起こることがあるが、これは遺伝子座異常男性プローブの使用によって後出可能である。FISHを用いて癌細胞中の染色体異常を認識される前に、特定の遺伝子の数が増大する。当分野において遺伝子増幅と呼ばれる現象が起こることがあるが、これは遺伝子座異常男性プローブの使用によって後出可能である。FISHを用いて癌細胞中の染色体異常を認識されると、細胞が到達した最遠距離を指揮して、それが、その多くの効果が段階に対し特異的で、最も効果的である。FISHを用いて癌細胞中の染色体異常を認識されると、細胞が到達した最遠距離を指揮して、これが、その多くの効果が段階に対し特異的で、最も効果的である。

時間と節約、患者の苦痛を最小化し、最も効果的な手段に特異的な治療を選択される。

1つの特定の染色体を（例えばフローアイソトープによって）分離することによってその染色体の全表面を均一に標識し、これを（例えば音波処理によって）物理的にもしくは（例えばエンドクレアーゼによって）酵素的に切断し、全片に対して1番のプローブは染色体を生ませることが可能である。全染色体アーロードの染色体ペインツとして知られており、標的部位すべての複数の蛋白質を光標識するものである。染色体ペインティングの重要な用途の1つはある種の癌で特異的に起るような2つの染色体間の欠損および転移の検出にある。

例えば、染色体群が特異的に線のペイントで標識され、染色体群が特異的ペイントで標識される場

15 は、患者の異なる細胞中のその遺伝子でINDEL増幅（多數の遺伝子複製）が起きたことを示す。線よりも赤の蛍光強度が強い（線/赤比の低下した）領域は、患者の染色体中の遺伝子大域部位を示し、赤と緑の蛍光が同事である領域はその部位でDNAの変化が起らなかったことを示す。CGHおよび閾値を用いる技術は従来の標識よりも複雑であるが、従来不可能であったよりも、より微細かつ正確な遺伝子変化を検出かつ定量化することを可能にするものである。

上記の説明から、模型判定、転移／再発腫瘍検出、染色体分布／増幅、および遺伝子マッピングが、単純な光像法によって、大いに利益を得ることがわかる。その理由は、このようない方法がサンプル測定時間を短縮し、ハイブリダイズされた蛍光プローブをバックグラウンドに残存するのから（小さな分光シフトによって）区別することを可能にし、極めて多数のプローブを同時に測定することを可能にするからである。

したがって、本発明の目的の1つは、プローブ技術における利点を活用するFISH撮像法を提供することにある。本発明によれば、任意の染色体分析において分析可能なプローブ数を大幅に増加させ、かつ併用技術の方法によって自動化的速度および精度を劇的に向上する。

本発明のFISH撮像法はスペクトラフィューラー系の点光源からの光束であり、单一の検出器鏡面内の全ビーセルからの蛍光スペクトルを同時に得、数多くのプローブの位置を検出できるものである。染色体異常性プローブおよび新規の標識法が入手できることに連関して、これらの方針は異なる（すなわち、ヒト核型について24色の異なる色でペイントされた各染色体を有するFISH型が形成可能である。これらの方法により、極めて高いサンプル処理能力が得られ、実質的に無限

云々

5. 比較ノムハハイドライゼン(=CGH)は逆色  
体ペインティングの装置であり、染色体の完全な組みから  
2つのカラーテルは正常な1組の染色体から発生し、他は  
1組の異常な(例えは黒縁)染色体から発生する。2つ  
のプローブは異なるレボータ分子を用い、例えは、正  
常なDNAが赤い螢光を示し、異常なDNAが緑の螢光を示す  
ようにする。正常な分裂中期のスプレットは両カラーテル  
で同時にハイブリッド化され、カラー画像分析を用いて

10 异常な(患者の)染色体の欠損もしくは転位を検出す  
る。逆色全体ペインティングは異常な染色体から男生し  
たオーバーを用いて、異常な染色体に物質を導与した機  
会な正常な染色体に由来するDNAを同定する。

11 (CGH)は逆色  
体ペインティングの装置であり、染色体の完全な組みから  
2つのカラーテルは正常な1組の染色体から発生し、他は  
1組の異常な(例えは黒縁)染色体から発生する。2つ  
のプローブは異なるレボータ分子を用い、例えは、正  
常なDNAが赤い螢光を示し、異常なDNAが緑の螢光を示す  
ようにする。正常な分裂中期のスプレットは両カラーテル  
で同時にハイブリッド化され、カラー画像分析を用いて

いられるDNAプローフを標識するためには、酵素反応を用いてヒオチンもしくはジオキシンのようなハイブリテンDNAに組み込む間接法を含む、数多くの方法が利用可能である。有絲分裂染色体スプレッドもしくは間隔後へのハイブリダイゼーションに続いて、蛍光標識を免疫吸収方法を用いてハイブリッドに付着させる。より近年には、蛍光染料は直接プローフに組み込まれ、中間ステップを用いることなく測定されている。標準的なISH検出にはフルオロセイン、ローダミン、テキサフレッド、およびカスクードブルーが含まれ、多プローブ分析は複数のプローブを異なるルーティンもしくは蛍光染料で標識するプロトコルで実現される。

ある電光体と呼ばれる分子に吸収された後に生じるものである。電子がより高いエネルギー軌道に移る結果、電子は励起状態まで高められる。この余分なエネルギーは電子が当初の基底状態に戻るときに放出し、光子を生み出す。蛍光は吸収光よりも波長が長い。このソフト制限されており、蛍光は屈折率=近傍で行われる。そのため、ある光分光鏡で励起される蛍光体は選択的に分離される。例えば、屈折角が色別域で異なるスルタルクトルを施す数多くの異なるプローブを使用しないで複数の光路を構成する。したがって、異なるスルタルクトルを用いることが可能となる。したがって、異なるプローブを識別可能とするためには、分辨率が極めて重要である。

本説明の方法によれば、各プローブに偽カラーが付され、その情報はコンピュータ画面に表示される。多色光の使用により、多色のプローブによって利益を受ける。また、PISHは重要な臨床用途にまで拡張する可能性が生ずる。その完全な実験性の検出が含まれる。單一のハイブリダイゼーションによって多種情報を得られるため、理解能力が向上し、遺伝子変異の詳報もしくは欠失の程度の測定のために内標準を用いることができる。本説明の方法は白色光源もしくはコヒーレント光半導体光源によって数個の狭い光光束で屈曲された当光、および希釈されたCCDを備えたセンサを用いるものである。したがって、各々異なるDNAプローブを複数個のスベクトラルを同時に測定することができる。このため、染色体の多色のナンバーショットを経た後で画像を再構成する。時間のかかるかつ人工的の結果が生じる。本説明に比べて画像の精度および精密度が向上する。本説明は、高精度、高速、かつ高精度に多色プローブの検出を可能にするため、将来の細胞培養・伝令的検査に対する銀鏡の進歩性を示すものである。

c. ミクロ環境変化の検出  
(例えば、抗体に付着した際の) 垂光染料の使用は一定の化学物質(例えばタンパク質)の存在を同定する

び多量体) の蛍光は、濃縮溶液において異常に H640n

分光生物撮影系の能力は全体細胞中の細胞小器官の機

Dici Praestet, Londonの第6章参照]。図では、図6の分光像で測定された数 dozen のスペクトルから選択された 2 つのスペクトルをプロットしたものである。スペクトル光帶の発光をスペクトロキューブ系で測定した。図7は試料から発光された背景光を明らかにする。赤色葉緑素蛍光 (右側) および試料中の細胞膜脂質からの遮断する緑

Mはアクリジンオレンジが単体である脂溶性蛍光試薬から選択されたものであり、スペクトルはアクリジンオレンジが二重体である複数種から選択されたものである。色励起光(左側)の双方が明確に認められる。赤色蛍光を示す個々の微細胞は部分的にしか見えない。試料の4つの異なるピクセルに由来する蛍光スペクトルを図10に示す。

アクリルシン-オレンジの結果とその部分的理屈との間のエネルギー移動の結果として分子内シフトを示す。図6および図8は、アクリルシン-オレンジの単量体形 (M) のおよび6Rは、アクリルシン-オレンジの単量体形 (M)。およぶように、スペクトルを類似性マッピング分析のた

なる形態の分子で示すものである。別にカルボン酸による結合によつて、細胞の構造および質膜に關して付加的な知見を可  
能性を示すものであるが、細胞の中心に位置していることを示している。図7cは、血液中の赤色蛋白が薄層電  
気泳動で測定するところであるが、細胞の中心に位置してい

能にするものである。図6は図6のスペクトルを参照スペクトルとして用いた親属性マッチング分析の結果を示す。これらから、異なる細胞部位で異なる

た。図6は四つのスペクトルを参照スペクトルとして用いた類似性マッチング分析の結果を示すものである。図6は、中の中の特定の細胞下領域から発せられる特徴的な螢光を可視化することもできた。図7は細胞複数分に由来する複数

図2-1-10に示す(細胞質内、このように半球形のアクリル樹脂)においては、染色体内のアクリル樹脂によって分光差を強調している。したがってマッピング分析を適用した場合の細胞内構造のスパンシング速度を強調するものである。また、二

するものである。したがって、本説明の方法は細胞成分によって構成された蛍光シフト（すなわち発光されたプロトノン）を反応する膜の細胞壁を明らかにした。さらに、この親回性は、細胞膜の位置も示す。

35 めで遅延によって物語されたに至る) を明らかにし、ついで現  
在の自然蛍光の研究は他の多くの用途を有している。例え  
ば、自然皮膚蛍光の研究は、異なった組織成分および組

葉綠素は自然（すなはち天然）蛍光を示す天然酵素で、葉綠素の組織学的標識に利用する「蛍光指紋」を同定した。組織分光指紋を用いて異常細胞から正常なものを識別する。

structure and function of chloroplast in plant cells. Clarendon, Oxford, U.K., 1984.]。発達論の当光学スペクトルは広範に研究されている。なぜなら、それは無性繁殖細胞である。

的光合成系のスペクトルよりも複雑であり [Pars et al., 1988], Photosynthesis and Other Reactions Involved in (1988) *Photosynthesis and Other Reactions Involved in Plant Cell Membrane*, ed. by H. Miki, pp. 1-10, Academic Press, San Diego.

Living Light, Biochemistry (London), また、著者、Scribner, 591 ページ、Macmillan New York)。また、著者、自然光は多くの用途で重要なためである。例えば、著者撮影の櫻花の写真が素晴らしいと思われる。

結果、自然蛍光測定を用いて細胞代謝をプローブし、光合成を追跡することができる。また、自然蛍光はポルフィリン類、天然細胞質タンパク質および他の化合物でも起因するので、細胞質内での位置を特定することができる。FRETは2つの蛍光体間の空間的距離を測定可能な「螢光共鳴エネルギー転移」(FRET)法である。FRETにおいては、「ドナー」および「アクセプター」と呼ばれる2つの異なる蛍光体が用いられ

それが蛍光を発するか、その後吸収したエネルギーを第2の蛍光体（アクセプタ）に転送して後者を蛍光発光させることができるように、注意深く選択される。したがって、蛍光スペクトルの違いからドナーとアクセプタとを識別することが可能である。

ドナーとアクセプタとの物理的分離は、エネルギー転送率は2つの蛍光体間の距離に強く依存する（典型的には効率は距離の6乗に逆数に比例する）。これらは異なる状態にある同一の分子に付着させ、（銀鏡鏡面に取り付けられた）分光生物顕微鏡を用いてRETを測定する」と、異なる分子（もしくは分子状態）を、それらの空間的分布を同時に測定しながら、識別する能力が容易なものとなる。エネルギー転送現象に関する詳細な考察は当分野の文献に見出すことができる [Herman (1989), Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, Part B, 第8章, 219~243ページ, Taylor and Francis Ltd; Jolivin and Arndt-Jovin (1989), Cell Structure and Function by Microspectrofluorimetry, 第5章, Academic Press社参照]。

RETは3つのパラメータを測定することによって行われる。これらは (i) ドナー吸収ピークで励起された時のドナー蛍光ピーク強度、(ii) ドナー吸収ピークで励起された時のアクセプタ蛍光ピーク強度、および (iii) アクセプタ吸収ピークで励起された時のアクセプタ蛍光ピーク強度である。次いで、これら3つのパラメータを補正および分析して、検査中の2つの蛍光体の分離距離および位置を得る。

分光生物顕微鏡、特にスペクトラキューブ系を用いることにより、測定結果が向上するのみならず、測定が容易になる。実際、分光生物顕微鏡を用ることにより、励起がドナー吸収帯にある場合にはドナーおよびアクセプタ吸収の双方が同時に測定可能であるため、2回の測定が必要とされない。

分光生物顕微鏡を用いることにより、RET法をさらに発展させることができること、例えば、RET用に、環境変化による影響を有するアクセプタを選択し、分子距離測定とともに、比輝度法を用いてミクロ環境変化をモニタることができる。さらに別の例としては、RETを2つの異なるアクセプタと共に用い、（異なる蛍光スペクトルで）2つの分離距離および蛍光体位置に附着する構造を同時に供給することができる。二重アクセプタ興奮を從来の方法で行うのは極めて困難である。分光生物顕微鏡の使用はRET結果の精度を高め、実験手順を簡略化し、より強力な分析法を可能にすることができる。

透過顕微鏡法

別でビ 片こか術る五わ  
組大はで～おの可～いテ  
がきけ吸ル示  
びルは小スのべ真強

細胞の細胞下図画を識別することが可能	5	細胞の細胞下図画を識別することが可能	5
したがって、細胞の細胞下図画の	10	細胞の細胞下図画の	10
決定因子の1つである	15	決定因子の1つである	15
から、染色された試料	20	から、染色された試料	20
ある程度は、経験によ	25	ある程度は、経験によ	25
る。科学者の経験によ	30	る。科学者の経験によ	30
ると、巨大分子との間の相	35	と巨大分子との間の相	35
がって、DNA染色のい	40	がって、DNA染色のい	40
果を評価しようとする	45	果を評価しようとする	45

その特異的な吸収および透過スペクトルを有している。研究の現時点では、「紫色ロマノウスキーキームサ複合体」と呼ばれるものと高い相関を有することのできる分光成分を示すいくつかの光像が存在する。ヘテロクロマチンの吸収スペクトル(図1c)は明らかに560nmにおいて顕著なピークを示しており、これは「紫色ロマノウスキーキームサ複合体」と記載されたものと良好に対応する[Pribrich et al (1990), *Histochemistry* 93, 247 ~256ページ; Bittaroli et al (1990), *Lasers in Surgery and Medicine* 10, 1502~1506ページ; Heman (1989), *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture*, ノートB, 第8章, 219~245ページ; Taylor and Wang編集, Academic Press; およびJovin and Arn dt-Jovin (1989), *Cell Structure and Function by Microspectrofluorometry* 第5章, Academic Press社参照]。分光的な細胞質特性(図9aのスペクトルB)は類似性マッピングに用いられる、接着、コルジング、細胞質膜、および細胞外膜を示すと考えた成分が明確に識別されることを可能とする。しかししながら、紫色を含む細胞は、空気中で乾燥されると、細胞質膜の重なりを招き、これによって見掛け上の解像度が低下することがある。細胞の厚さに集中し、したがって、この技術の可操作性を阻害に向かうことのできるアルデヒド固定細胞の使用が、分光画像をさらに発展させるために示唆される。

ある場合には、透過法および染色組織を用いて得た

分光像が、蛍光顕微鏡によって見出されるものと類似した情報を提供することができる。分光生物学組織と透過顕微法とを組み合わせることの利点の1つは、

「クリーンな」測定技術が使用可能であること、すなわち、潜在的に毒性のある物質もしくは固定剤を使用する必要がないことである。

したがって、本発明によれば、高い空間および分光解

像度を特徴とする分光生物学組織が提供され、この方法

(a) 分光撮影されたべきサンプルを調製する工程

(b) そのサンプルを光学装置を通して観察する工程

程、この光学装置は撮像分光計に光学結合されており、

光学装置および撮像分光計は、(1) コリメート光学要

素を用いてサンプルの全ビセルから入射光を同時に収

集し、(ii) コリメートされた入射光を多數の要素を有

する干渉計系に通し、また、光が干涉計内部で異なった

方向に進行する2つのコヒーレント光線に分割され、次

いで2つのコヒーレント光線が再結合されて互いに干渉

して出射光像が形成されるようになる。(iii) 出射光像

を検出器要素の2次元アレーを有する検出器上に出射

光像を収束させる收束光学系に通し、各時点で検出器要

素の各々がサンプルの1つの、全測定期間を通じて常に

同一のピクセルであり、サンプルの実像は検出器アレー

上で固定され、測定中のあらゆる時点では可視かつ

50 50、当該像は理解されるように、生物学的用語に用いら

るその特異的な吸収および透過スペクトルを有している。

研究の現時点では、「紫色ロマノウスキーキームサ複合

体」と呼ばれるものと高い相関を有することのできる分

光成分を示すいくつかの光像が存在する。ヘテロクロマ

チンの吸収スペクトル(図1c)は明らかに560nmにおいて

顕著なピークを示しており、これは「紫色ロマノウス

キーキームサ複合体」と記載されたものと良好に対応す

る[Pribrich et al (1990), *Histochemistry* 93, 247 ~256ページ; Bittaroli et al (1990), *Lasers in Surg*

ery and Medicine 10, 1502~1506ページ; Heman (1989), *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture*, ノートB, 第8章, 219~245ページ; Taylor and Wang編集, Academic Press; およびJovin and Arn dt-Jovin (1989), *Cell Structure and Function by Microspectrofluorometry* 第5章, Academic Press社参考]

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

示す2つの細胞は、図13のスペクトル2を参照して用意して用いてマップされた。一方が他のよりも大きな藻類細胞液胞を含むもので、それぞれタイプIおよびタイプII細胞に対応する [Morris et al. (1994), Appl Spectroscop 48, 857-865]。図13の低屈光強度スペクトル3を網目性マッピングの参照として使用すると、図14に示すように、2つの交配細胞の細胞質を見ることができる。藻類系分類の次はこれらの細胞中の藻共生体状態を明示する。

14

部位の位置を明らかにすることができた。最もしくはフェオファイチンの同定可能ないし、ペクトルの分光マッピングおよび画像再構築により得られた画像は生化学過程の空間情報をより決定させ含んでいる。したがって、本研究の方法を使えば、光像分析は、酵素反応中に分光変化が起こる生における代謝過程を明らかにするために理屈的

る様クロマチツンを剪断し器用させて、仁および細胞質を好んで基性を失い、増加するヘモクロビン含量を得る。このシーケンスは任意の段階で分割されるが、それらは通常3段階、すなわち（I）好塩基性もしくは初期赤芽球、あるいは正赤芽球A、（II）多染色性もしくは中間赤芽球B、あるいは正赤芽球B、（III）正染色性もしくは後期赤芽球、あるいは正幼红球C (Hayhoe and Flemans 1992) Hematological Cytology, 第3版, 11ページ, Wolfe Publishing Ltd., London]。正染色性正赤芽球は小型で核

ロマチンおよび細胞質成分のスペクトル（それぞれ図6-3のスペクトルA,B,C）を赤血球新生の4段階（すなわち赤血球の分化）を代表する4つの細胞の元画像の複数の10個の細胞との類似性マッチング分析のための参照スペクトルとして使用した。上述のように、類似性マッチング機能は1つの選択されたスペクトルの面積部分と分光キューブの他のスペクトルとの間の差を計算する。再構成された画像はグレースケールに対応して明るさの変化したピクセルからなり、2つの層の類似性の程度を明

よつ、英施例1は、適當なアルカリ性と組み合ひ  
18 骨頭止血  
セネチーリニ酸カルシウムと組み合ひ

濃縮性であり、その細胞質はわずかに多染色性である。

16 示す。そこで、この実験では、 $\Delta$ を示すが明るいほどである。

- |  |  |  |  |   |
|--|--|--|--|---|
|  |  |  |  | 細胞からの分光情報は明らかにできることを示す。                             |
|  |  |  |  | 空間情報を得る強度および全スペクトルの点数の情報                            |
|  |  |  |  | の双方を明らかにし、これらの情報によれば、類似性マ                           |
|  |  |  |  | ンピングアルゴリズムを用いて同時に生化学情報を明ら                           |
|  |  |  |  | かにことができる。結果のミクロ蛍光光度法を用い                             |
|  |  |  |  | たり、挿入ドットフィルタを用いた場合には、ピクセル                           |
|  |  |  |  | の情報は容易に得られなかつて、交換可能なフィルタ                            |
|  |  |  |  | に基づいた比想像は、容易に得られない主要な分光情報                           |
|  |  |  |  | を必要とするため、本質的な制限を有している。もう1                           |
|  |  |  |  | つの制限は、少數の過当なフィルタを調節する必要性で                           |
|  |  |  |  | ある。このように、フィルタをベースとした操作はサン                           |
|  |  |  |  | ブルの被覆および空間依存性の強度を容易に得ることの                           |
|  |  |  |  | できるものではない。一方、分光强度の回転フィルタ                            |
|  |  |  |  | 装置は生物学的方法には適でない [Morris et al (19                   |
|  |  |  |  | 94), Appl Spectrosc 48: 857~866]。ブリズム光学             |
|  |  |  |  | 分光法と組み合せた共焦点走査レーザ顕微鏡法 [Trepa                        |
|  |  |  |  | ti et al (1994), J Microsc 176: 238~244] はピク        |
|  |  |  |  | セル分光情報を見らかにする能性を有するが、多ビ                             |
|  |  |  |  | クセル分光情報を可視化するためにフーリエ変換多ビ                            |
|  |  |  |  | クセル分光法を適用した。ソクリムンの食物サイクルの                           |
|  |  |  |  | 生化学は2つの主工程からなり、その1つはあらゆるエ                           |
|  |  |  |  | ンドサイト-トーシス性小脳の一般則として、攝取物を液胞                         |
|  |  |  |  | 内へのプロトンボンディングによって酸性化することであ                          |
|  |  |  |  | る。次の工程では、エンドサイト-トーシス性小脳とのリソ                         |
|  |  |  |  | ーム融合によって、加水分解性酵素がエンドサイトー                            |
|  |  |  |  | シス性小脳を加水分解するエンドリソームを形成す                             |
|  |  |  |  | る。低pHと加水分解性リソーム活性によつて、図15                           |
|  |  |  |  | 分子AおよびB)に示すように、天然酵素系はフェオ                            |
|  |  |  |  | ファイテンに滅活する。酵素系からのマグネシウムの喪                           |
|  |  |  |  | 失は630nmまでの分光光度計である。                                 |
|  |  |  |  | さとなるリゾーム酵素が水分子解離性により、テトラ                            |
|  |  |  |  | ビルロールを開き、豊光性のない吸収強度を形成する                            |
|  |  |  |  | (図15の分子C)。これら3つの状態は上記に示されて                          |
|  |  |  |  | おり、このような変化が生じた細胞部位の位置を明らか                           |
|  |  |  |  | にした。分光情報を使用すれば、天然酵素およびフェ                            |
|  |  |  |  | オファイテンの部位および、滅活サイクルの終点を示す                           |
|  |  |  |  | 。結果のミクロ蛍光度法を用いることによって、生                             |
|  |  |  |  | 細胞の標的的分析が可能である。                                     |
|  |  |  |  | 血球の標的的分析におけるアズレオチノン染色                               |
|  |  |  |  | を用いるメイグランブルード-ギームもしくはロマノ                            |
|  |  |  |  | ウスキ法のいずれかによる染色に基づく。分光マイクロ分                          |
|  |  |  |  | 析は從来の方法で染色された細胞を得られるデータをも                           |
|  |  |  |  | 強調することが認められた。すなわち、分光サブトラク                           |
|  |  |  |  | ション法を用いて、ガルブレス等 [Galbraith et al]                   |
|  |  |  |  | は様々な細胞構造の識別着色が染料成分の割合変化によ                           |
|  |  |  |  | って説明できるつことを示した [Galbraith et al (198                |
|  |  |  |  | 0), J Microsc 119 (3): 313~30]。フリードリヒ               |
|  |  |  |  | 等 [Friedrich et al] はロマンクスキー-ギーム染色                  |
|  |  |  |  | された細胞膜は、いわゆるロマンクスキ希薄と呼ばれる、                          |
|  |  |  |  | 染料結合体の着色团に由来する、強く強い吸収峰を550nm                        |
|  |  |  |  | 波長に有していることを示した。他の吸収峰はDNAに結合し                        |
|  |  |  |  | たアスールBのかタチオンに由来するものとされた [Frie                       |
|  |  |  |  | drich et al (1990), Histochemistry 93 (3): 247~251] |
|  |  |  |  | 。エオシンのアニオーンはB型球形細胞のアスールB骨                           |
|  |  |  |  | 格に結合する。エオシン吸収はエオシンと電荷的中性的                           |
|  |  |  |  | コントラスト化された分光ミクロ分析を用いることによ                           |
|  |  |  |  | り、スピナ等 [Spina et al] は良性和悪性乳房                       |
|  |  |  |  | 組織の間の著著な区別を明らかにした [Spina et al (19                  |
|  |  |  |  | 992), Virchows Arch-B-Galen-Pathol 62 (2): 111~     |
|  |  |  |  | 9~24]。この方法の原理は、メイグランブルード-                           |
|  |  |  |  | ギムサ法で染色された疊合の粗さのパラメータとして、                           |
|  |  |  |  | 真正クロマチックからヘテロクロマチック集への高いコ                           |
|  |  |  |  | ントラスト勾配の急激な変化の分析に基づいたものであ                           |
|  |  |  |  | る。この方法においては、コンピュータに撮影された2                           |
|  |  |  |  | つの画像ローバスフィルタの間のサブトラクションが用                           |
|  |  |  |  | いられ、したがつて、デジタル化された画像上には高コ                           |
|  |  |  |  | ントラスト勾配の値が保持・比較される。双方は一連の定                          |
|  |  |  |  | 性的形態変化を示す。赤血球系列のうち、最も初期に認め                          |
|  |  |  |  | られた、前赤芽球は、一般に原始細胞を特徴                                |
|  |  |  |  | づける、細胞質好塞性、仁、微細な網状もしくは点状                            |
|  |  |  |  | 核クロマチンおよび大きな細胞汁法を有している。前赤                           |
|  |  |  |  | 芽球は一連の有核細胞を生じ、赤芽球は融合度が増大す                           |

る核クロマチンを軽く凝集させて、仁および細胞質好酸性を失い、増加するヘモクロビン含量を得る。このシーケンスは任意の段階に分割されるが、それらは通常3段階で、すなわち、(I) 好酸性もしくは初期赤芽球、あるいは正赤芽球A、(II) 多染色性もしくは中間赤芽球、あるいは正赤芽球B、(III) 正赤色性もしくは後期赤芽球、あるいは正赤芽球C [Hayhoe and Flaman (1992), *Hematological Cytology*, 第3版, 11ページ; 和歌山: Wolfe Publishing Ltd., London]。正常赤色性正赤芽球は小型で球形であり、その核質はわずかに多染色性である。

特許第3280035号

1



増進し、これは被毛藻による同化を示唆することを示した。アンモニウム濃度の変化は被毛藻の集団密度に影響を与える [Muscatine et al. (1989), Proc. R. Soc. Lond. B 236:311~324]。ハイテル [Butheil (1988), Proc. 6th Int. Coral Reef Symp. Australia, 2535~2540] は被毛藻によるアンモニウムの正味摂取があること、およびアミノ酸の濃度によって分離されたあらゆるアンモニウムは共生的関係で再利用されることが示されたことを示した。被毛藻が正味可能性がないことによってこの関係の生産性が最もしく制限されたことを示す。被毛藻はその刺胞動物宿主の活性によって生成される藻類およびリノン富んだ排泄物をくらむと獲ける [Lambert et al. (1970), Limnol. Oceanogr. 15:579~586]。アンモニウムの内部排泄は関係の藻類葉状のいくからを供給する。この藻類保存および回収方法は食塗藻水槽での生存に不可欠である。しかしながら、回収は植物的な藻類を供給するものではないため、これらの要求を満たすために外部供給源も必要となる。

被毛藻の集団密度は藻類供給によって制限される [Hegel-Guldberg and Smith (1989) Mar. Ecol. Prog. Ser. 57:173~186; および Cook and D'Elia (1987) Symbiosis 4:119~212]。サンゴと密接な関係で生息するこれらは被毛藻の藻類密度の増加率を招く。メイヤーおよびシューク [Meyer and Schulte (1985), Limnol. Oceanogr. 30: 57~166] はサンゴ頭部上に満生する魚がその排泄物で光合レペルを増加させることによって組織のバイオマスおよび被毛藻密度を増加させる可能性のあることを示唆した。

また、サンゴは様々な無脊椎動物を潜在させており、そのいくつかは定着性であってサンゴ骨骼に付着しておらず、他は内部に潜伏するかサンゴ組織および骨骼に覆い被さっている。サンゴに生育するカニであるクリットララス・コラリディテス (*Cryptochitrus coralliphilus*) は巨大なサンゴ骨骼中のくぼみに見出され、イスラエル国エイラットのファヴィダエ (*Faviaea*) サンゴに寄生的なものである。ポツ [Potts (1986), Paper from the department of Marine Biology:33~60] はこれらのかの形態およびそれらのくぼみについて記載した。しかしながら、カニとその宿主との関係の本質は不明である。サンゴ共生体はそれらの排泄物を、被毛藻を含む近隣の藻に寄与することができるものと示唆される。

ビルガマナニア (*Prymnesiophyceae*) サブファミリーを構成するフジシボはサンゴの競争的共生体である。何人かの著者はサンゴヒーフジシボとの間で物質の交換があること主張しているが、そのような関係は未だ確認されていないか。クック等 [Cook et al. (1991) Hydrobiologia 216:285~290] はフジシボ (*Savignium millororum*) をら排泄されたりがその宿主 (*Millepora dichotoma*)

の繊毛藻によって吸収されることを示した。イカイ種 (*Lithophaga*) は生体サンゴの骨骼内に潜伏する [Kleemann (1980), *Reef J. Moll. Stud.* 46:13~54]。これらは生体サンゴ骨骼を成長用特異所として用い、その上の海藻から醸造によって食物を摂取する。また、アストレオボラ・ミリオファルマ (*Astrofurmophilum*) に生息するリトアーマ・シンフレックス (*Lithophaga simplex*) によって摂取されるアンモニアムが宿主サンゴの繊毛藻によって吸収されることが示された。

したがって、共生的養分生物の捕獲物が周囲領域を蓄積化するとの推測される。これは、葉緑素濃度の増加によって示される共生体近傍における高い葉緑素濃度を招くものであつた。このような微小な距離において葉緑素の密度を測定することは困難であり、知られていない限りにおいて、この距離内での変化は明らかになつていなかつた。

本実験例は、この問題を実験的に解消することができると本男爵の方針の使用を記載するものである。すなわち、スペクトルキューピングシステムを用いて、小領域での葉緑素濃度変化を検出した。

葉緑素分子が光で励起されると、自然蛍光として知られる過程によってフォトンが発せられる。分子から蛍光によって解放された光はその屈折光よりも赤く、逆流する、あるいは振動エネルギーの損失を示す。生体内での葉緑素の蛍光発光スペクトルはその主端域を685nm附近に有する。多くの光合捕獲料が溶液中で蛍光を示すことが知られているが、生体内では葉緑素<sup>a</sup>の蛍光が支配的である。なぜなら、他の色素はそれらの吸収したエネルギーを比較的高い効率で葉緑素<sup>a</sup>に転送するからである。この蛍光の測定は葉緑素<sup>a</sup>の排出および見掛けのための手段を提供する [Kirk (1983), *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*, Cambridge University, Cambridge, 401ページ]。365nmもしくは405nmで励起される」と、細胞動物組織はそれらの組織中の蛍光物質により、異なった放送で蛍光する。しかしながら、650nmを超える波長の蛍光源は葉緑素中の葉緑素である [Blauv (1985), *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 120:189~191]。ハーディ等 [Hardy et al. (1982)], *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 88:247~255は、可視範囲に先づて葉緑素濃度を明瞭にかくするために葉緑素蛍光を測定した。

この目的で、エレクトロードのインターフェース側にインステディチュートの前の虹吸で試料を採取した。以下のサンゴおよびその觸鬚物質を蛍光分析に用いた。すなわち、ファヴァイテス・ハリコラ (*Favites halicora*) と、六カニ (*Cryptochitrus coralliorhynchus*)、ヨニアストレーファーガ・レンゼシアニア (*Lithophaga leiospsianus*) およびヒドロサンゴ (*Millepora dichotoma*) ヒップツヅボ (*Saviniun milliporum*) である。サンゴは英語

で葉緑素蛍光ビークの生長スベキモを用いた。図22は、 $\mu$ CO<sub>2</sub>は正規化された $\mu$ CO<sub>2</sub>と $\mu$ CO<sub>2</sub>によって得られた結果である。図22の上部は、 $\mu$ CO<sub>2</sub>による葉緑素蛍光ビークの増加率と $\mu$ CO<sub>2</sub>濃度との関係である。図22の下部は、 $\mu$ CO<sub>2</sub>による葉緑素蛍光ビークの増加率と $\mu$ CO<sub>2</sub>濃度との関係である。

トは共生で、强度蛍光を示す典型的な力が観察される。また、アストレマトマ(その沿った明るい線域)を用いて、図25aに示す陽で見出される。値は、回帰式による。ブチルアルコール抽出でき、図25aは、類似性質を有する量を測定する。光輝度性光とビンディングスペクトルの差が、ジボウシが、図25aよりしたがったが、無着色剤の葉茎光とトランセラ合、葉茎群のものである。アラガボリ性マツツおよびミツバは、抽出する。

によって、ヨニアストアボラ・ディコトマの筋肉分布が示された。ヨニアストアボラ・ディコトマの筋肉分布は、筋肉強度の変化は、筋肉強度の高い筋肉群から、これより筋肉群が弱い筋肉群へと移行する。ヨニアストアボラ・ディコトマの筋肉分布は、筋肉強度の変化は、筋肉強度の高い筋肉群から、これより筋肉群が弱い筋肉群へと移行する。

化の識別を可能にした。これらの方は小さな表面鏡像部からの蛍光を測定し、これをその標本における標點強度と関連づけることを可能にした。解像度は使用される光の波長によって決まるが、この実験では、波長約400 nmの青色の光を用いた。この実験の目的に対し、測定強度が蛍光測定は、またアレーの部分強度を明らかにできることを示す。

光マッピングおよび再構築することはできない [Goto et al. (1983), J. Photocham. Photobiol. B, 20: 223-233]。本器用の方法のもう1つの利点は、細胞中の標的を測定する分光的方法の多くは破壊的であり、濃度測定では通常溶液中の抽出後に行われるのに対し、本実験条件下で用いられた方法は生体内での標的測定を可能としたことにある。サンゴでは通常、ウォーターピックを用いて組織を除去し [Johannes and Weble (1970), Limnol. Oceanogr., 15: 822-824]、抽出後、分析を行う。ウォーターピックを用いて組織を除去することにより、小さな部分ごとにサンゴ表面領域の検査ができくなり、サンプルの空間的境界は不明瞭になるが、本器用の方法を用いれば、サンゴは無傷のままであり、測定後は水に戻すことができた。

(PISH)  
実験結果  
スペクトラキューブおよび一次結合アルゴリズムを用いた、改良された潜光インシチュハイブリダイゼーション

本系明の方法と組み合わせたスペクトルキューピングシステムを用いた分光生物検査は、1回の測定で高精度に、多段のプローブの同時に検出を可能にすることによって、FLISHの有用性を高める。この結果、FLISHによる遺伝子異常の検出における効率および信頼性が大幅に向上了る。

ることができた。その後、ドット1および2はテキサス州レッドのものであり、ドット3および4はローダミンのものである。

図27a～bは6つのプローブを用いた、間期における  
mRNAのハイブリダイゼーション後のRT-PCR検定の1例で

ある。図27aは元画像を示し、図27bはすべての検出された対のスペクトラキューブ測定、分光処理および人工着色

色ディスプレイを示し、図27Bは、スペクトラキューラシステムを用いる3重ジクロイックフィルタを通して検出された、ハイブリダイゼーション後の6つの染色体の

ベルされている）を示す。（蛍光体、プローブおよび架橋剤の組合せによって、この「活性化」が異なる。

色体の詳細については、後述の表2およびChroma Corp. Cat No. 61502の記載を参照されたい。)

図27a)初期の細胞接の元RGB画像を示すものであり、

用いても、色を互いから識別することは困難であることが明らかである。熟練した觀察者でも最良の場合に6色

のうち、3色を検出できるに過ぎない。しかしながら、図27bは、バックグラウンド・サムトラクションおよび

表2

染色体	蛍光体	蛍光ピーク	ディスク
8	SpectrumOrange TM 1	588 nm	レイ色
10	SpectrumGreen TM 1	538 nm	茶( B 1 )
(C)			シアン
X	Aqua 1	480 nm	青( B 2 )
1	TexasRed 2	615 nm	黄( Y )
17	FITC 3	526 nm	緑( G )
11	ToxosRed 2 + FITC 3	615, 525 nm	赤( R 1 )
background	DAPI 4		黒( B 3 )

- 1 V. Y. S. I. S., Downey, R. S., Groves, J. L., U. S. Patent No. 4,510,262, dated April 16, 1985.
- 2 A protein containing a TexasRed 2 and FITC 3 is combined with a ToxosRed 2 and FITC 3.
- 3 A protein containing a ToxosRed 2 and FITC 3 is combined with a TexasRed 2 and FITC 3.
- 4 A protein containing a ToxosRed 2 and FITC 3 is combined with a TexasRed 2 and FITC 3.
- 5 A protein containing a ToxosRed 2 and FITC 3 is combined with a TexasRed 2 and FITC 3.
- 6 A protein containing a ToxosRed 2 and FITC 3 is combined with a TexasRed 2 and FITC 3.
- 7 A protein containing a ToxosRed 2 and FITC 3 is combined with a TexasRed 2 and FITC 3.
- 8 A protein containing a ToxosRed 2 and FITC 3 is combined with a TexasRed 2 and FITC 3.
- 9 A protein containing a ToxosRed 2 and FITC 3 is combined with a TexasRed 2 and FITC 3.
- 10 A protein containing a ToxosRed 2 and FITC 3 is combined with a TexasRed 2 and FITC 3.

図27aに示した6つの蛍光体の各々の正規化された分光強度の比較において、各蛍光体の波長で測定を行なった結果が得られる。

光シグナルチャから、数個の比較的広い分光範囲で測定を行うフィルタに基づいたシステムでは、スペクトル同士が大きく重なり合っているため、異なるプローブ種を確実に識別することは不可能であることが明らかである。このようなシステムは、各プローブの強度の絶対的測定により保存し、したがって、バックグラウンド信号およびノイズにより影響される。さらに、細胞自体に由来する自然蛍光でも分光の重なりが生じることに留意された。

多くの異なる外観を呈することになる。しかしながら、プローブの化学的環境の小さな変化により、第2の場合の蛍光スペクトルは第1のものからわずかにシフトしている。スペクトラキューブシステムは、その分光強度および感度により、この影響を緩和することができた。同様の影響は、サンプル管型中に充分に充満されなかつたプローブについても存在し、脱った管型の診断に寄与する。したがって、本発明の方法と組み合わせられたスペクトラキューブシステムは、脱った診断の起こる危険性を低減することを目的とする。

bおよび27a～cの例は、多数のプローブを検出および識別することが可能であること、および、それら間に小さな分光差が存在していれば、スペクトラキューブが1回の測定でそれらを検出かつ同定することを示している。

当業者は、他のおよび／もしくは既知のおよび未発見または未開拓の蛍光体および蛍光体の組み合わせを上述の様々なFLISH用途に使用して多数の部位を同時に検出したり、各染色体の名前で染色したりできることが明らかである。從来の細胞および分子生物学で使用される蛍光体のリストは、Kasten (1993), Introduction to Fluorescent Probes: Properties, History and Applications in Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Research, Mason & Academic Press Ltd, London, 24～31ページに記載される。また、例えば、生物発光および化学発光のよう他の標識法ならびに蛍光標識法も同様に適用できることが当業者は明らかである。

したがって、FLISH分析にスペクトラキューブシステムを使用することによって、以下のよう主な利点を得ることができる。スペクトラキューブシステムはその高分光強度によって多数のプローブの同時検出を可能にするのに対し、従来の手段を用いて（例えは、蛍光標識法を用いて、FISHを行う）、1回のハイブリダイゼーションに使用されるプローブ数が2～4に制限される。したがって、FLISH分析にスペクトラキューブシステムを使用することによって、労力および時間が節約される。さらには、FISH分析にスペクトラキューブシステムを使用するに全分析に少数の細胞しか必要でなくなるが、これは分析すべき細胞の数が限られている場合には重要な特徴である。

い、この場合にも、各ビクセルについて分光情報を得られることによって、自然蛍光の寄与が除去でき、より正確な結果が得られる。

3 プローブを含有するチメハーフリダイズしたジオキシゲニン抗体を介して結合したフルオレセインーR-イソチオシアニンアヌート

4 カウンタ染色に用いられる4'-6-ジアミノ-2-フェニルドーナル

特許第3280035号

ophthalmology Preferred Practice Patterns, San Francisco, Calif.: American Academy of Ophthalmology, Quality of Care Committee Retinal Panel, American Academy of Ophthalmology, 1989)。

しかししながら、示されたスクリーニングケーションは高価であり、また、ある個人にとっては、患者は診断スクリュールされた検査の間に深刻な網膜症を進行させることもあるため、現在の高価なスクリーニングでも充分ではない。それに加わらず、スクリーニングは費用が高いことが示されている [Javitt et al (198

9), Ophthalmology 96:255～64]。この研究は、危険性を示すとともに、現在の高価なスクリーニングでも示している。したがって、糖尿病網膜症のスクリーニングの精度を向上し、それにかかる費用を低減することのできるあらゆる方法は臨床的価値の高いものとなる。

現在、糖尿病網膜症のためのスクリーニング評価として推奨されているものには、詳細な網膜写真および網膜された場合におけるカラー網膜写真法が含まれる。

20 [Diabetic Retinopathy American Academy of Ophthalmology Preferred Practice Patterns, San Francisco, California, American Academy of Ophthalmology Quality of Care Committee Retinal Panel, American Academy of Ophthalmology, 1989]。網膜のフルオレンジ血管撮影法は現在日常的に行われているが、侵襲略めて、不快なものであり、時に死を招く。さらに、フルオレンジ血管撮影法で得られる附加的な情報は患者の脚座のレーザ治療の恩恵を受け得るものとそうでないものとに分類する助けとなる [Ferris (1993), (解説) JAMA 269:1290～

30 1]。本基準によれば、スペクトラキューブ技術を特別に開発されたアルゴリズムと組み合わせ、分光データと撮像情報を同時に用いて（例えは、糖尿病網膜症の段階を分類することにより、網膜出血や網膜血腫などの段階を分類することにより、網膜出血や網膜血腫などの段階を分類することができる、したがって、医者が多くの糖尿病患者を虚血性のものと非虚血性のものとに分類することを可能にする臨床手段となる。

網膜への酸素供給は脈絡膜および網膜循環の双方によつて供給される。脈絡膜は無次級の外網膜中の光受容体への酸素源であり、網膜循環は内網膜中の中性要素および糖尿病患者を虚血性のものと非虚血性のものとに分類する。

たす。網膜の高い酸素要求により、糖尿病網膜症、高血圧、糖尿病性眼病、および血管閉塞性疾患において観察されるような循環変化は機能障害および広範な網膜組織を招く。

スペクトラキューブシステムを使用した網膜異常診断装置の各点の全スペクトルを測定することによって、プローブの特異性の問題も克服することができる。実際には、ある染色体DNA配列に適合するプローブは別の（通常は類似した）配列に対してより低い感度でハイブリダイゼーションを行なうが、これは、染色体を有し、この第2の配列よりもより低い感度でハイブリダイゼーションする。この結果、ある種のプローブが異常に吸収した [Diabetic Retinopathy: American Academy of Optics 27, 1113～1125に掲載されたピットマン (Pi



示し、これは白黒カメラを通して撮影されるオリジナル

イメージや、図2bのように白黒イメージとして表示され

たイメージと非常に良く似ている。しかしながら、図か

ら分かるように、サンプルに固有の重要なスペクトル情

報を有しておらず、サンプルを通じた光に影響され、

顕微鏡ランプのスペクトルを主として有する。一方、図

3b, 3cに示されるように、多くの固有スペクトル、例え

ば、BV(およびPSV)を用いて同様に得られた強度イメ

ージは新たな効果を示す。活性細胞(図2bのA)の胞膜の

まわりのピクセルおよび活性細胞のみが他の部分より高

い強度(図3b, 3cにおける白色ゾーン)を示し、一

方、正常細胞(図2bのB)は他のイメージ部分より低い

強度(図3b, 3cにおける暗色ゾーン)を示す。このた

め、図2bに示されるように検査イメージにおいて存在確

が非常に低い主要コンポーネント10および13に応答する

物質もしくは構造は、それがなんであれ、活性細胞に帶

があり、正常細胞の下で検出されるということを輪付け

ができる。このため、ある「アイド」とともに構成

される一つもしくは複数のイメージを示すという実験

を、本発明により測定されるときに各タイプを分

類するためには用いることができる。

まとめると、先の米国特許出願第8/392,019号に、二

次元のセンサおよび電子機器を組み合わせて導かれる

特に高感度の干涉法に基づくユニバーカル光検像システ

ムが述べられており、これによれば、空間的に系統だっ

た方法で何百千ものスペクトルを同時に特定しコンピュータに記憶することができる。本発明は、これら機器

(ハードウェア)が生物研究、医学治療および診断に比

くつかの波長ではなく多數の波長に対して集められる

いう事実から、本発明は、(1)例えば、同一の患者の

活性および無活性組織表面を比較するので、各患者の組

織を比較する場合は異なり、着色効果を自動的に除去

することができる。(2)異なる医療での強度の比較を行

うことができるので、(3)異なる医療では独立したスペク

トル効果を自動的に除去することができ、(4)一旦、

システムソフトウェアが適切な特性強調(例えば、人工

色もしくは他の手段の使用)を行ったり、適切なディス

プレイ(例えば、コンピュータの画面もしくはビデオ画

面)上に強調イメージを表示したりすると、イメージに

おける求める特徴およびその境界を容易に視覚化してユ

ーザに示すことができる。

本発明のさらなる効果は、フィルター、格子およびそ

の他の分散技術による周知のFresnelもしくは多重反射

フェリエ変換分析法であり、これはスペクトル測定に

おいて高いS/N比を示す。但し、ノイズレベルが信号か

ら独立している(背景もしくはシステム限定)時、

およびノイズ信号が全スペクトルレンジでの平均信号より

高い場合である。

本発明のさらなる効果は、先の米国特許出願第8/39

2,019号に詳細が示されている空間的な光学形状によ

り、このシステムコンセプトおよびシステムハードウェ

アのものを複数すべきどのようなサンプル表面にも用

いることができ、現存するもしくは将来開発されるどの

ような撮像光学系にも用いることができるということであ

る。

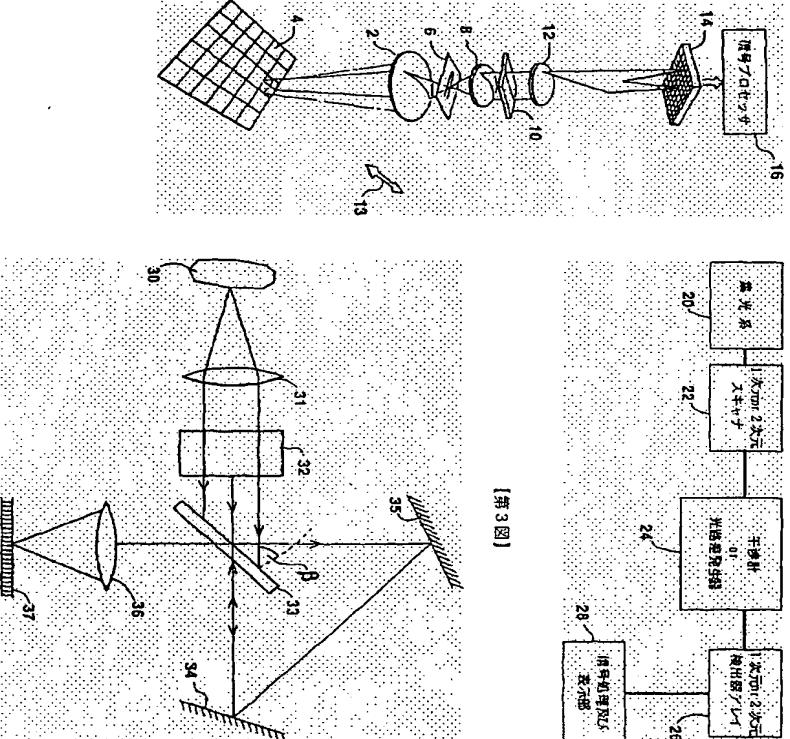
光分析システムもしくは撮像分

析する撮像装置を用いて、もしくは将其の

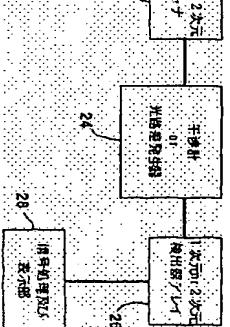
明を説明したが、これ以外にもたくさんのお客様の変形

連する多種の用途を見いただすことができる明瞭である。

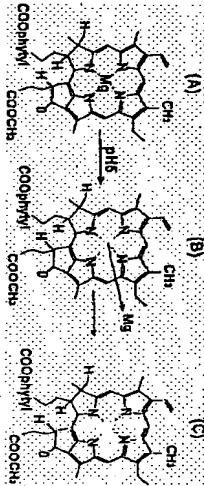
[第1図]



[第3図]



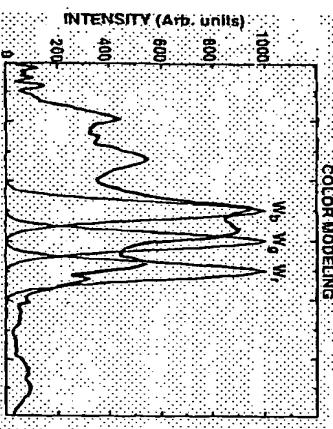
[第2図]



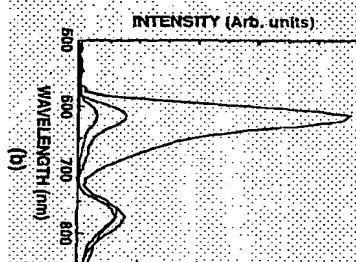
[第15図]

本発明が優れている点は、分光測定および測定データをサンプルの全ての点(すなわち、ピクセル)において独立して且つ同時に収集できるので、サンプル位置を開拓して物質および分子タイプおよびその集中度に附する情報を提供でき(これにより物質の存在および集中度をマップ化できる)、さらに、これと同時に収集の撮像法も同時に得ることができることである(これにより從来の形態学的解析(例えば、米国特許第4,965,725号参照)も可能となる)。このため、本発明は、光通過、反射、散乱および蛍光法を用いて高い空間およびスペクトル解像度で、細胞および組織成分、構造、器官、遺伝物質、投光と遮光遮断フローブの存在検出および定量検査や、細胞および組織内での染料葉剤の分配測定を行うことができる。本発明のさらなる効果は、分光分析データの変換が非常に複雑であることである。本発明に係るデータは位置毎に集められるのではなく、撮像画面から集められ、い

[第4図]

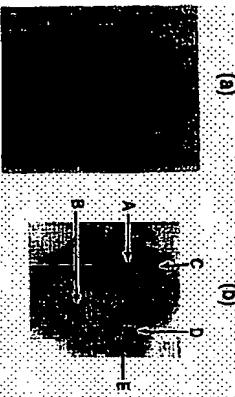


[第5図]

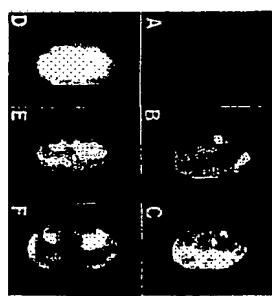


(a)

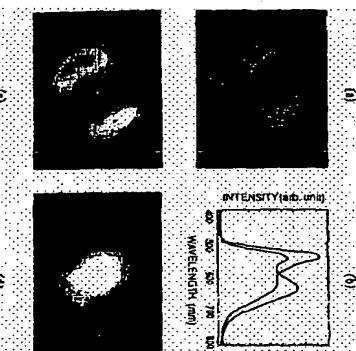
[第6図]



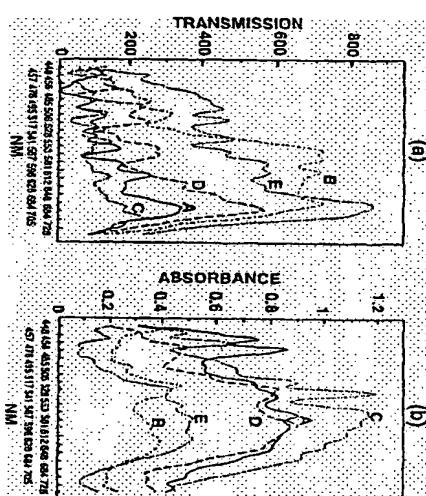
[第12図]



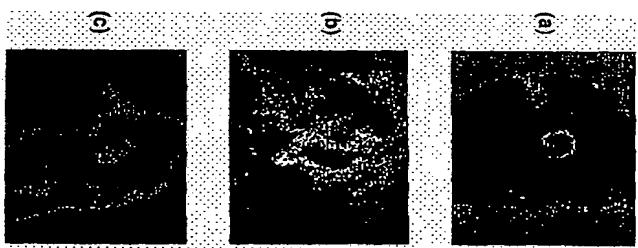
[第6図]



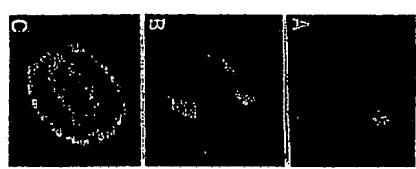
[第9図]



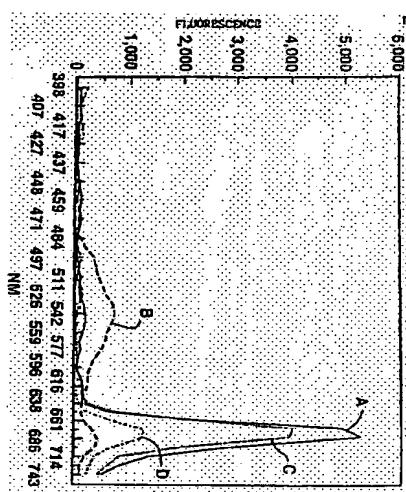
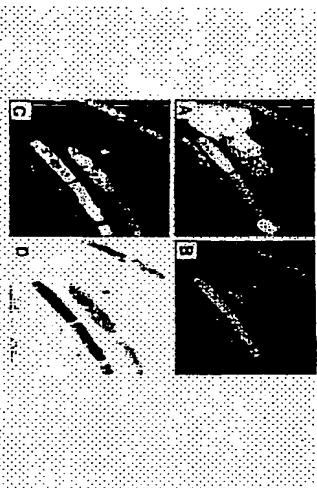
[第25図]



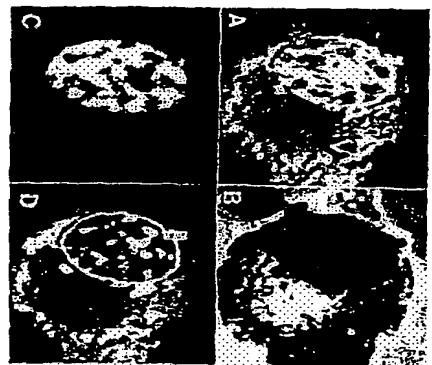
[第14図]



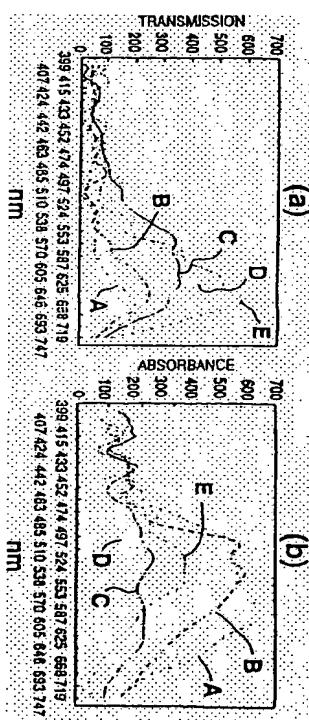
[第7図]



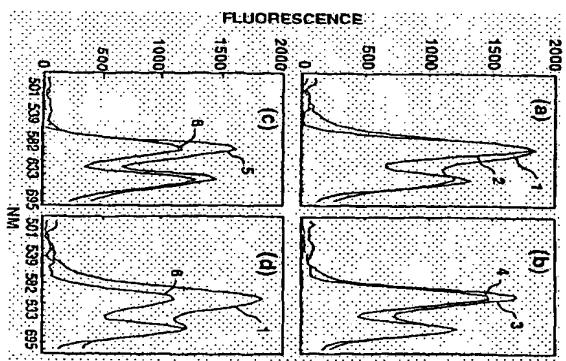
[第16図]



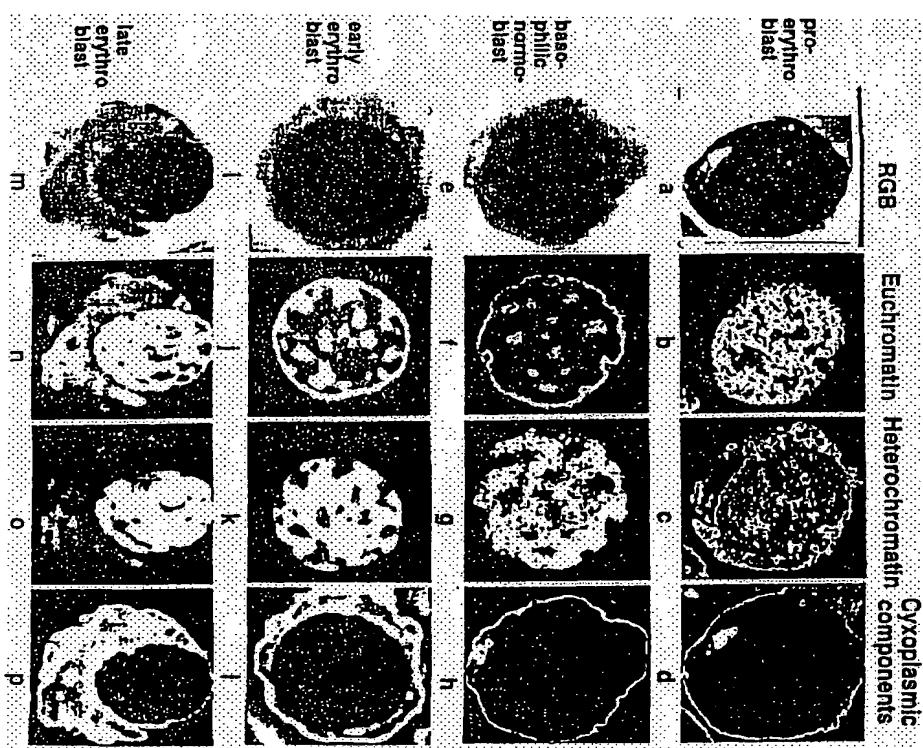
[第16図]



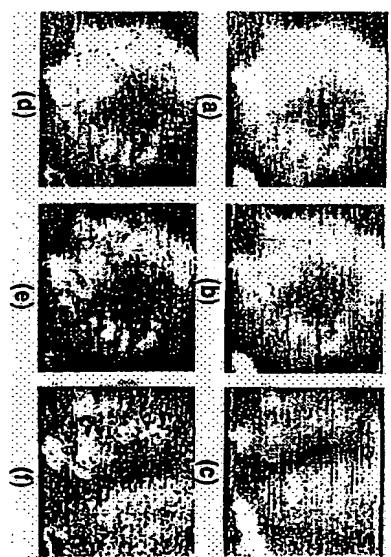
[第11図]



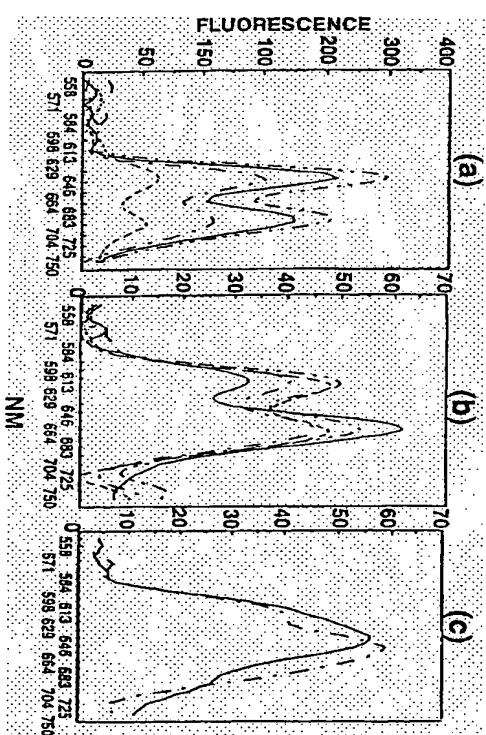
[第17図]



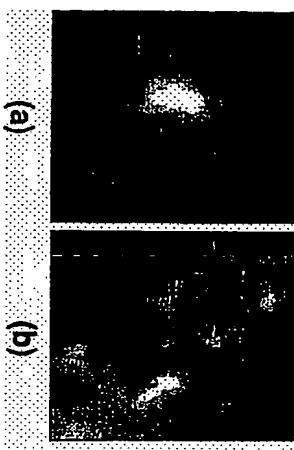
[第18図]



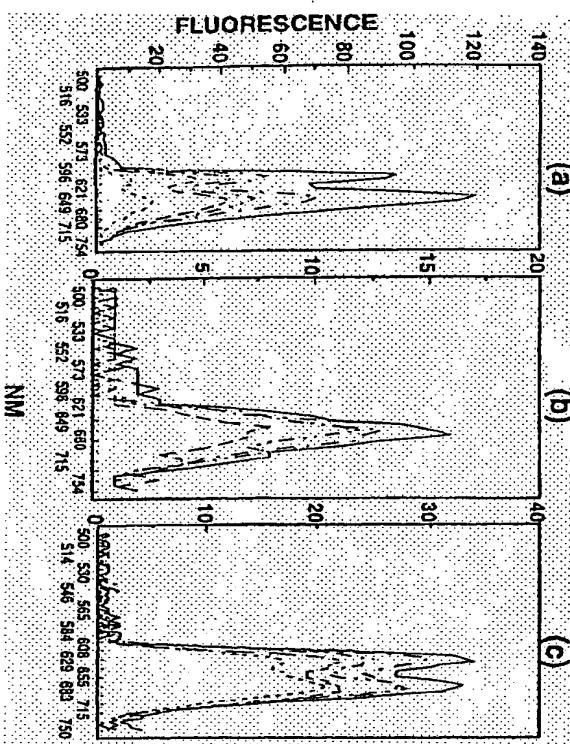
[第19図]



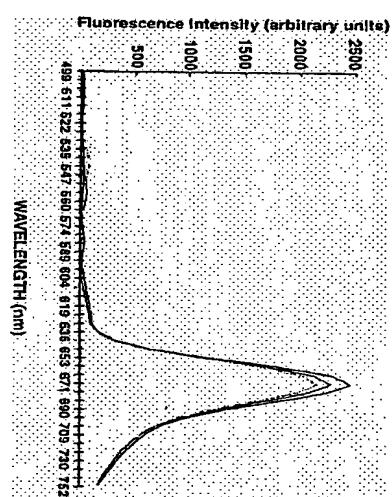
[第20図]



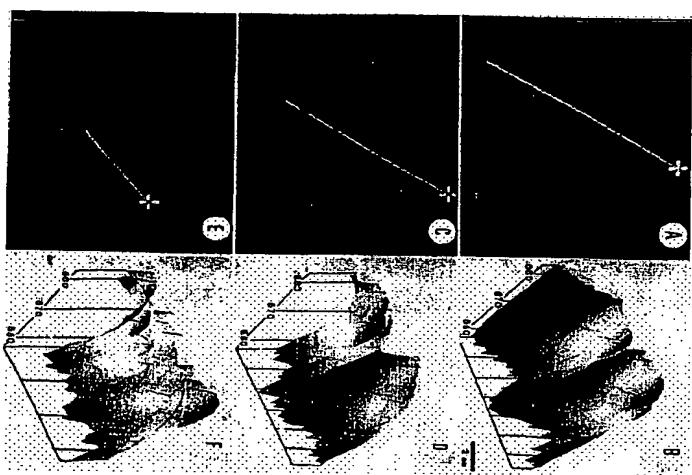
[第21図]



[第22図]



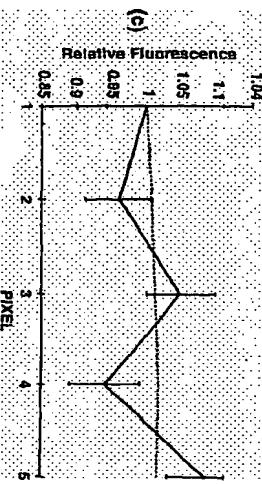
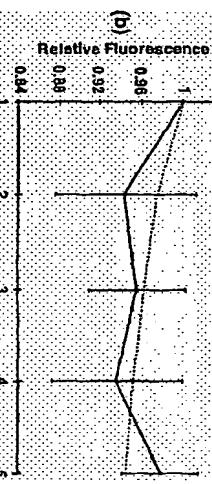
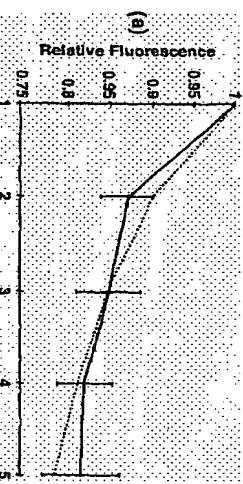
[第23図]



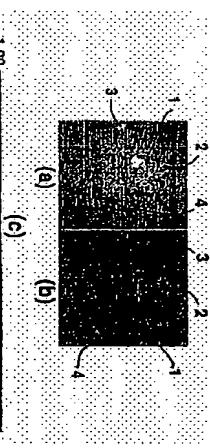
特許第3280035号

特許第3280035号

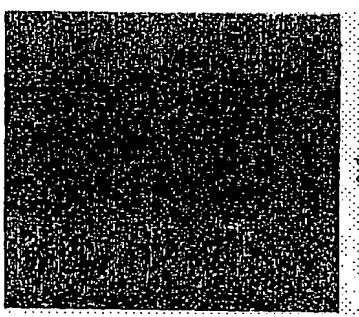
[第24図]



[第26図]



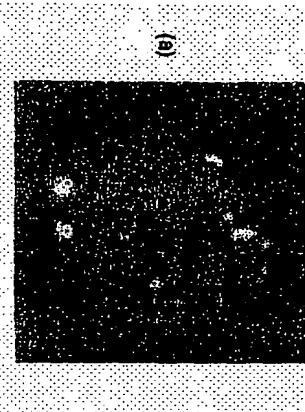
[第30b図]



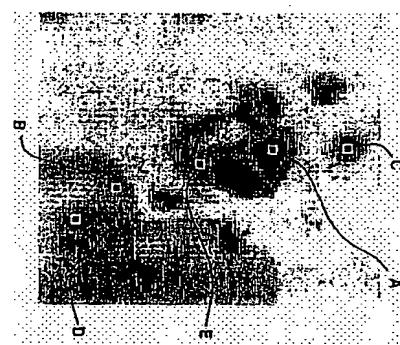
特許第3280035号

特許第3280035号

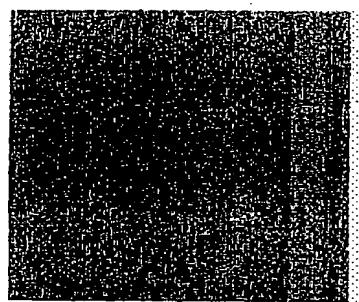
[第27図]



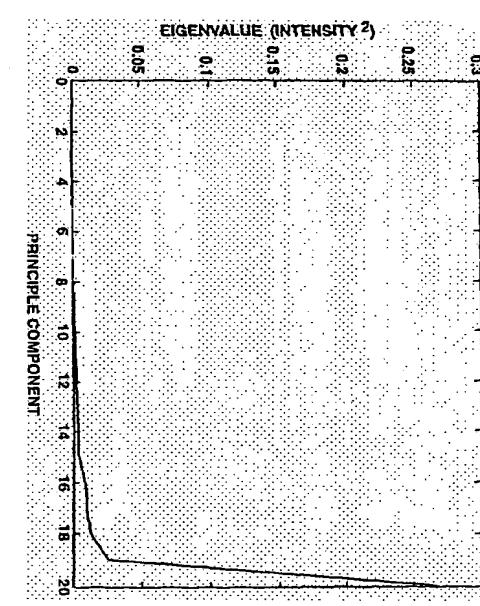
[第27c図]



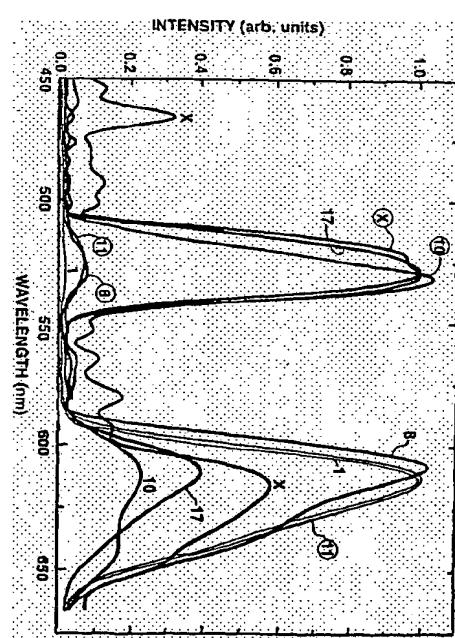
[第27c図]



[第30c図]



[第29図]



フロントページの続き

(51) Int.Cl.  
G 01 B 11/00  
G 01 J 3/443  
G 01 J 3/443

F 1

G 01 J 3/443  
G 01 N 21/27

E

特許第3280035号

G 01 N	21/27	21/64	E
	21/64	P	
33/48	33/48	C	
33/483	33/483		
G 02 B	21/36	A 61 B	E
		3/12	
(72)発明者 ダーク ジー ソエンクセン			
アメリカ合衆国 カリフォルニア			
92008, カールスバッド, チェンシャイア	10	(56)参考文献	特開 平4-339225 (JP, A)
3638			特開 平7-301562 (JP, A)
(72)発明者 ダリオ カビノ			
イスラエル国、ティムラート 23840,			
ハボルシュ 7			特開 昭61-38116 (JP, A)
(72)発明者 ロバート エーバックワルド			
イスラエル国、ラマトイシャイ 15			
30095, ハダガントリート			特開 平7-244239 (JP, A)
ジビ マリック			特開 平7-10814 (JP, A)
イスラエル国、クファー ハロエ			特開 平5-296334 (JP, A)
38955,			特開 平6-30684 (JP, A)
20			特開 平7-17483 (JP, A)
			特開 平7-209187 (JP, A)
			特表 平5-50367 (JP, A)
			特表 平11-50339 (JP, A)
			米国特許4976562 (U.S., A)
			米国特許5539517 (U.S., A)
			国際公開95/18236 (WO, A1)
			国際公開95/20148 (WO, A1)
25			
(58)調査した分野(Int.Cl. ; DB名)			
601N	21/62 - 21/74		
601N	21/00 - 21/01		
601N	21/17 - 21/61		
601N	33/48 - 33/50		
601J	3/00 - 3/52		
E P A T (QUE STEL)			
J I C S T ファイル (JOIS)			
W P I / L (QUESTEL)			
実用ファイル (P ATOLIS)			
特許ファイル (PATOLIS)			
30			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**